

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE FARMACOTECNIA Y  
ADMINISTRACIÓN FARMACÉUTICA**

**Desarrollo y validación de una técnica analítica por  
cromatografía líquida de alta performance (HPLC)  
para cuantificar clonixinato de lisina 125 mg y  
pargeverina clorhidrato 10 mg en tabletas recubiertas**

**TESIS**

**para optar al título profesional de Químico Farmacéutica**

**AUTORES**

**Yulissa Paola Azaña Sulca**

**Jeanette Roxana Cornelio Bello**

**ASESOR**

**Alfredo Castillo Calle**

**Lima-Perú**

**2007**

## **DEDICATORIA**

A mis padres Julio y Consuelo por su amor incondicional, a mis hermanos: Juana, Iris, Julio y Percy por sus sabios consejos, y en especial a mi hijo Mathyas Rodrigo por ser el motivo y la felicidad de mi existencia.

Yulissa

A mi madre Sabina Bello por su amor, confianza e incansable esfuerzo por darnos lo mejor.

A mis hermanos José y Danitza por su incondicional apoyo y consejos.

A Melania por llenar de energía y alegría nuestras vidas.

Jeanette

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por la formación profesional recibida.

A los profesores de la Facultad, quienes nos impartieron conocimientos que son el soporte de nuestro desarrollo profesional.

Al Laboratorio FARPASAC S.A. por permitirnos desarrollar nuestro trabajo en sus instalaciones y en especial a la Dra. Natalí Valdez, a la Dra. Amy Betetta y a la Dra. Rocío Farfán por su apoyo y conocimientos brindados.

A nuestro asesor y maestro Mg. Alfredo Castillo por su apoyo incondicional, por ser nuestra guía y modelo profesional a seguir.

A nuestras amigas Lucila Millones, Maria Luisa Fort y Claudia Arcos por sus consejos y por mantener nuestra amistad cada día más fortalecida.

A nuestros padres y hermanos por su confianza y esfuerzo infatigable por logrnarnos profesionales.

A todas las personas que hicieron posible realizar el presente trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	6
II. OBJETIVOS	9
Objetivo General	
Objetivos Específicos	
III. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
IV. HIPOTESIS	13
V. METODOLOGIA	13
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	13
VII. GENERALIDADES	
Asociación Clonixinato de Lisina y Pargerverina Clorhidrato	14
7.1.1. Clonixinato de Lisina	15
7.1.1.1. Propiedades físicas y químicas	15
7.1.1.2. Propiedades farmacológicas	16
7.1.2. Pargerverina Clorhidrato	16
7.1.2.1. Propiedades físicas y químicas	16
7.1.2.2. Propiedades farmacológicas	17
Cromatografía Líquida de Alta Performance HPLC	17
7.2.1. Concepto	17
7.2.2. Partes	18
7.2.2.1. Fase Estacionaria: Columna	18
7.2.2.2. Bomba	20
7.2.2.3. Inyectores	20
7.2.2.4. Detectores	21

7.2.2.5. Sistemas de toma y procesamiento de datos	22
7.2.3. Aptitud del sistema	22
7.2.4. Interpretación de cromatogramas	23
7.2.5. Establecimiento del método en cromatografía de líquidos	24
7.2.5.1. Selección de la columna	25
7.2.5.2. Selección de la fase móvil	26
7.3. Calificación del Sistema	28
7.3.1. Calificación del HPLC	29
7.3.1.1. Calificación de Instalación	29
7.3.1.2. Calificación Operacional	30
7.3.1.3. Calificación de Performance	30
7.3.2. Calibración del Instrumental	31
7.3.3. Verificación de equipos	31
7.4. Método Analítico	31
7.4.1. Concepto	31
7.4.2. Fases en el desarrollo de un método analítico	31
7.5. Validación de métodos analíticos	32
7.5.1. Concepto	33
7.5.2. Tipos	
7.5.2.1. Validación Prospectiva	33
7.5.2.2. Validación Retrospectiva	33
7.5.2.3. Revalidación	34
7.5.3. Etapas	35
7.5.4. Características analíticas	35
7.5.4.1. Exactitud	35

7.5.4.2. Precisión	36
7.5.4.3. Especificidad	37
7.5.4.4. Sensibilidad, Limite de detección, Limite de cuantificación	40
7.5.4.5. Linealidad e Intervalo	43
7.5.4.6. Robustez	45
7.5.4.7. Tolerancia	45
7.5.5. Criterios de Validación a estudiar en función del tipo de método analítico	46
7.6. Calidad en la Industria farmacéutica	47
7.6.1. Calidad	47
7.6.2. Control de Calidad	48
7.6.3. Aseguramiento de la calidad	48
7.6.4. Gestión de la Calidad	49
7.6.5. Sistema de Garantía de Calidad	50
7.6.6. Normativa Internacional	51
7.6.7. Buenas Prácticas de Manufactura	52
7.6.8. Buenas Prácticas de Laboratorio	52
VIII. PARTE EXPERIMENTAL	53
IX. RESULTADOS	93
X. DISCUSIONES	95
XI. CONCLUSION	100
XII. ANEXOS	101
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

## RESUMEN

Se desarrolló una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar los principios activos clonixinato de lisina y pargerverina clorhidrato en tabletas recubiertas, debido a que la técnica de análisis para este medicamento compuesto no se encuentra en libros oficiales. La técnica de análisis para ambos principios activos es realizada en un solo sistema (fase móvil, columna cromatográfica, longitud de onda), diferenciándose sólo en la preparación de la muestra y el volumen de inyección por lo que no pueden ser cuantificadas en un solo cromatograma, debido a la gran diferencia de sus concentraciones en la tableta y sus propiedades de solubilidad.

Previamente a la validación se evaluó la aptitud del sistema. Los resultados fueron conformes a las especificaciones para un método cromatográfico recomendadas por la USP 30, comprobando que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal.

Para la validación se evaluaron los parámetros de desempeño de la técnica como son: Selectividad, Exactitud, Precisión, Precisión Intermedia, Linealidad y Rango. Los resultados de estos parámetros se sometieron a pruebas estadísticas demostrando que la técnica analítica propuesta para la cuantificación de los principios activos es selectiva, exacta, precisa y lineal, así mismo la confiabilidad de la nueva técnica, garantizando de esta forma la calidad, eficacia e inocuidad del medicamento.

**Palabras claves:** Clonixinato de lisina, pargerverina clorhidrato, cromatografía líquida de alta performance, validación, técnica analítica

## SUMMARY

An analytical technique by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed to quantify the active principles lysine clonixinate and pargerverine chlorhidrate in covered tablets, because the technique of analysis for this compound medicine is not in official books. The technique of analysis for both active principles is made in a single system (movable phase, chromatographic column, wavelength), being different itself only in the sample preparation and the volume of injection reason why cannot be quantified in a single chromatogram, due to the great difference of their concentrations in the tablet and its properties of solubility.

Previously to the validation the aptitude of the system was evaluated. The results were in agreement to the specifications for a chromatographic method recommended by the USP 30, verifying that the equipment, the electronic system, the analytical operations and the samples to analyze constitute an integral system that can be evaluated like so.

For the validation the parameters of performance of the technical were evaluated as they are: Selectivity, Accuracy, Precision, Intermediate Precision, Linearity and Range. The results of these parameters were also put to the test statistical demonstrating that the proposed analytical technical for the quantification of the active principles is selective, exact, precise and linear, to the trustworthiness of the new technical, guaranteeing of this form the quality, effectiveness and harmlessness of the medicine.

**Key words:** Lysine clonixinate, pargerverine chlorhidrate, high performance liquid chromatography, validation, analytical technique



## I. INTRODUCCION

En el mercado farmacéutico actual existen varios medicamentos de gran demanda por la población, cuyas técnicas de análisis no se encuentran publicadas en las obras oficiales que generalmente se consultan, a saber: Farmacopea americana, británica, europea y japonesa. Esto hace necesario desarrollar nuevas técnicas de análisis en el laboratorio con el fin de separar y cuantificar los principios activos de dichos medicamentos.

Por lo tanto, el desarrollo y validación de técnicas analíticas para medicamentos es una tarea que se viene realizando en diferentes laboratorios farmacéuticos peruanos en los últimos años, debido a las exigencias de calidad y a la mejora de la productividad.

Los procedimientos para la evaluación de los niveles de calidad de los medicamentos en el país están dados por la Dirección General de Insumos, Medicamentos y Drogas (DIGEMID) a través del Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos, como instrumento normativo necesario para cautelar la calidad en la fabricación de los productos farmacéuticos. Este organismo gubernamental se rige, a su vez, de reglamentaciones dadas por organismos internacionales reconocidos oficialmente como Food and Drug Administration (FDA), Organización Mundial de la Salud (OMS), Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Conferencia Internacional Tripartita Sobre Armonización (ICH), Farmacopeas Europeas y Americana.

En el presente trabajo se ha desarrollado una técnica de análisis para cuantificar clonixinato de lisina 125 mg y pargeverina clorhidrato 10 mg en tabletas recubiertas por Cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Las razones de la preferencia de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria y en muchos campos de la ciencia.

Así mismo, para el desarrollo de la técnica fue necesario conocer las propiedades fisicoquímicas de los principios activos: peso molecular, estructura química, valores de pK (constante de solubilidad), solubilidad, etc., y/o las propiedades de la formulación.

Finalmente, la técnica fue validada según lo recomendado en la USP 30, realizando una aptitud del sistema y evaluando el método con los parámetros de desempeño en cuanto a selectividad, exactitud, precisión, precisión intermedia, linealidad y rango.

El desarrollo y validación de la presente técnica analítica fue realizada en el laboratorio FARPASAC en el Departamento de Control de Calidad durante los meses de Mayo a Julio del 2007.

Este trabajo aportará conocimientos técnico-científicos que pueden ser aplicados en la actividad de las áreas de control de calidad e investigación de los laboratorios farmacéuticos del país.

## II. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General:

- Desarrollar y validar prospectivamente una nueva técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para cuantificar clonixinato de lisina 125mg. y pargeverina clorhidrato 10mg. en tabletas recubiertas.

### 2.2. Objetivos Específicos.

- Desarrollar una técnica de análisis capaz de cuantificar los principios activos del medicamento.
- Demostrar mediante la validación la confiabilidad del nuevo método.
- Lograr la conformidad del medicamento respecto a las especificaciones garantizando su calidad, eficacia e inocuidad.
- Cumplir con las normas de la Dirección General de Medicamentos y Drogas (DIGEMID): Buenas Prácticas de Manufactura y Buenas Práctica de Laboratorio, con respecto a los medicamentos para ser comercializados.

### III. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El nuevo producto desarrollado en el laboratorio Farmacéutica del Pacífico S.A.C. (FARPASAC) es un medicamento que asocia dos principios activos: clonixinato de lisina y pargerverina clorhidrato. Dicho medicamento ya se expende en el mercado farmacéutico del país como un medicamento espasmolítico y analgésico destinado a la terapéutica patogénica y sintomática de los síndromes espasmódicos de origen gastrointestinal, hepatobiliar, urinario o genital, cualquiera sea su grado de intensidad y evolución (1). Sin embargo, la técnica de análisis no se encuentra publicada en las obras oficiales a las que generalmente se consulta, a saber: Farmacopea Americana y Británica. Esto hace necesario desarrollar una nueva técnica de análisis en el laboratorio para separar y cuantificar dichos principios activos.

Para desarrollar una técnica analítica de cuantificación es necesario, en primer lugar, establecer el método analítico más conveniente a ser utilizado. Para esto se debe conocer la naturaleza fisicoquímica de los principios activos: peso molecular, estructura química, valores de pK (constante de solubilidad), solubilidad, etc. y/o las propiedades de la formulación.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es una técnica de separación y cuantificación de compuestos químicos. La mayoría de las drogas, sean compuestos no volátiles o térmicamente inestables pueden analizarse mediante esta técnica sin riesgo de descomposición. Sólo los

compuestos que tienen diferentes factores de capacidad pueden ser separados por HPLC (2).

Las razones de la preferencia de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies órganometálicas y una cierta variedad de sustancias inorgánicas (3).

Por lo tanto, los componentes activos del medicamento, por sus características, pueden ser identificados y cuantificados mediante la técnica de HPLC.

Por ser una técnica desarrollada internamente en el laboratorio FARPASAC, debe ser validada de acuerdo a los requerimientos establecidos en la USP 30 (Farmacopea Americana) y la International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH).

Con este procedimiento se probará la confiabilidad de la técnica analítica para asegurar la calidad, eficacia e inocuidad del medicamento. Por tanto, la validación de la técnica analítica constituye un instrumento importante a este respecto.

El desarrollo y validación de técnicas analíticas para materias primas y/o productos terminados es una tarea que se viene realizando en diferentes laboratorios farmacéuticos peruanos en los últimos años, debido a las exigencias de calidad y a la mejora de la productividad. Como una muestra de ello se tiene las siguientes tesis realizadas:

- Validación del Método de Valoración de Loratadina en tabletas por Cromatografía Líquida de Alta Presión y Estudio Comparativo In Vitro de las diferentes marcas del producto comercializados en el país, 1999.
- Validación del Método Analítico de Valoración del Dobesilato de Calcio 500mg capsula por Espectrofotometría de Absorción UV Visible, 2001.
- Desarrollo y Validación Prospectiva de una técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para el Enalapril 10 mg. tabletas cubiertas, 2004.
- Validación del Método de Valoración de Glimperide presentación comprimidos de 4 mg. por el Método de Cromatografía Líquida de Alta Performance HPLC, 2004.

Los procedimientos para la evaluación de los niveles de calidad de los medicamentos en el país están dados por la Dirección General de Insumos, Drogas y Medicamentos (DIGEMID) a través del Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos, como instrumento normativo necesario para cautelar la calidad en la fabricación de los productos farmacéuticos (4). Este organismo gubernamental a su vez se rige de reglamentaciones dadas por organismos internacionales reconocidos oficialmente como Food and Drug Administration (FDA),

Organización Mundial de la Salud (OMS), Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Conferencia Internacional Tripartita Sobre Armonización (ICH), Farmacopeas Europeas y Americana.

#### IV. HIPOTESIS

La nueva técnica analítica desarrollada para la cuantificación de clonixinato de lisina 125 mg y pargerverina clorhidrato 10 mg tabletas recubiertas por cromatografía líquida de alta Performance, cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

#### V. METODOLOGIA

Metodología experimental, validación prospectiva categoría I.

#### VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

Pasos o etapas del estudio:

- a. Calibración y calificación de los equipos e instrumentos.
- b. Calificación del HPLC.
  - i. Calificación de instalación
  - ii. Calificación operacional
  - iii. Calificación de performance
- c. Desarrollo de la técnica analítica cuantitativa para clonixinato de lisina y clorhidrato de pargerverina en tabletas.
- d. Ensayo de aptitud del sistema cromatográfico.
- e. Validación de la técnica analítica:
  - i. Selectividad
  - ii. Exactitud



- iii. Precisión o repetibilidad
- iv. Precisión intermedia
- v. Linealidad.
- vi. Rango
- f. Evaluación estadística de los resultados.
- g. Discusiones.
- h. Conclusión.

## VII. GENERALIDADES

### 7.1. Asociación Clonixinato de Lisina y Pargerverina Clorhidrato.

Es la asociación de dos principios activos en una forma farmacéutica que disminuye el tono y la motilidad del músculo liso de las vísceras huecas, poseyendo un leve efecto neurotrópico potenciador que por su escasa magnitud no presenta efectos atropínicos adversos (visión borrosa, sequedad de la boca, sedación, estreñimiento y retención urinaria.) (5), sin embargo en pacientes particularmente sensibles o con la administración de dosis elevadas, puede aparecer sequedad bucal o constipación, modificables mediante un ajuste posológico (1). Asimismo, es un analgésico y antiinflamatorio no esteroide (AINES) que se metaboliza a nivel hepático y se elimina por la orina.

La asociación de Clonixinato de Lisina y Pargerverina Clorhidrato en una forma farmacéutica, resulta un medicamento que actúa como antiespasmódico-analgésico en afecciones del aparato digestivo: síndrome espástico doloroso esofágico, gástrico, pilórico y colitis.

Afecciones de las vías biliares: colitis hepática, colecistitis, síndrome postcolecistectomía. En urología ha demostrado su efectividad en cólicos renales y uretrales, cistitis y cistopielitis, litiasis renal o ureteral.

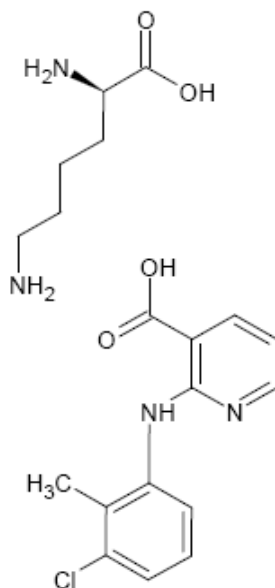
(5)

#### 7.1.1. Clonixinato de Lisina

##### 7.1.1.1. Propiedades físicas y químicas

Formula Molecular:  $C_{13}H_{11}ClN_2O_2 \cdot C_6H_{14}N_2O_2$

Formula estructural:



Peso Molecular: 408.88

Apariencia: polvo blanco

Olor: Ninguno

Punto de Fusión: 170-175 °C

Solubilidad: Soluble en agua, metanol y cloroformo (6)

#### 7.1.1.2. Propiedades farmacológicas

El clonixinato de lisina es un analgésico no narcótico que inhibe la enzima prostaglandina sintetasa, responsable de la síntesis de prostaglandinas, a su vez responsable directa de la estimulación de los neurorreceptores del dolor. Por ello se llama comúnmente antiinflamatorio no esteroideo (7). Es derivado del ácido nicotínico o ácido o-aminobenzoico (8). Se absorbe rápidamente después de la administración oral, metabolizándose casi en su totalidad sin acumularse aún con administración crónica. Muestra una cinética bicompartimental por vía endovenosa (intravenosa). La farmacocinética de este ingrediente activo no se modifica por la edad ni por la ingesta de alimentos. Se han detectado niveles ínfimos en leche materna.

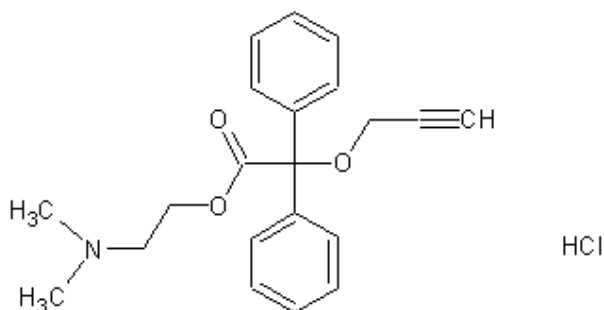
La posología más común es de 125 mg cada 8 horas. (9) (10)

#### 7.1.2. Pargeverina Clorhidrato

##### 7.1.2.1. Propiedades físicas y químicas

Formula Molecular:  $C_{21}H_{23}NO_3 \cdot HCl$

Formula Estructural:



Peso Molecular: 373.87

Apariencia: polvo blanco

Olor: Ninguno

Punto de Fusión: 170-175

Solubilidad: Soluble en agua, metanol y cloroformo. (9)(11)

#### 7.1.2.2. Propiedades farmacológicas

La Pargeverina Clorhidrato disminuye el tono y la motilidad del músculo liso de las vísceras huecas, poseyendo un leve efecto neurotrópico potenciador que por su escasa magnitud no presenta efectos atropínicos adversos. Presenta una cinética bicompartimental después de la administración endovenosa (intravenosa) de manera tal que en fase de distribución tiene una vida media de 20 minutos y una eliminación de 4 horas, con velocidad media de 30 l/ hora. Luego de la administración por vía oral, en la primera hora se alcanza un nivel plasmático con tiempo medio de absorción de 0,2 horas; la concentración plasmática máxima obtenida fue de 150 ng/ml, con velocidad media que no difirió de la observada luego de la administración endovenosa (intravenosa). (10)

Químicamente es un alcaloide de naturaleza sintética cuya característica principal, de interés analítico, es poseer una amina terciaria. (12)

### 7.2. Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)

#### 7.2.1. Concepto

La cromatografía de líquidos de alta performance (HPLC, por sus siglas en inglés), también llamada cromatografía de líquidos de alta resolución,

es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. (13)(14)

## 7.2.2. Partes

### 7.2.2.1. Fase Estacionaria y Fase Móvil.

Para la mayoría de los análisis farmacéuticos, la separación se logra por la partición de los compuestos presentes en la solución de prueba entre la fase móvil y la estacionaria.

Los sistemas que constan de fases estacionarias polares y fases móviles no polares se describen como de fase normal, mientras que, por el contrario, cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina cromatografía en fase reversa.

La cromatografía de partición se emplea para compuestos solubles en hidrocarburos de peso molecular menor de 1000. La afinidad de un compuesto por la fase estacionaria, y por consiguiente su tiempo de retención en la columna se controla mediante una fase móvil más o menos polar. La polaridad de la fase móvil puede variar mediante el agregado de un segundo y, a veces, un tercer o hasta un cuarto componente. (13)

Las columnas para cromatografía de líquidos se construyen normalmente con tubos de acero inoxidable de diámetro interno uniforme, tienen una longitud entre 10 y 30 cm. Por lo común, las columnas son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando

dos o más columnas. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm; y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son de 3,5 a 10  $\mu\text{m}$  de formas irregulares o esféricas. (3)(15)

Las fases estacionarias para la moderna cromatografía de líquidos de fase reversa constan normalmente de una fase orgánica químicamente unida a sílice u otros materiales. La sílice o también llamado silicagel es un sólido amorfo y poroso de gran área superficial (30 a 500  $\text{m}^2$ ) y alto volumen de poro (0,4 a 1,2  $\text{ml/g}$ ), de diámetro de poro entre 60 a 300  $\text{\AA}$ , químicamente es un óxido de silicio hidratado ( $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), sus átomos internos ligados por  $\text{O}_2$  y los superficiales por  $\text{OH}$ .

La partícula de la fase ligada está compuesta por un material de base: silicagel, alúmina, agarosa, copolímero de estireno, que se unen químicamente a un compuesto con un grupo funcional determinado. La unión mas frecuente es la de silicagel por medio de una unión covalente tipo siloxano  $\text{Si-O-R}$ . (16)

Las partículas pequeñas recubiertas con una capa delgada de fase orgánica proporcionan una baja resistencia a la transferencia de masa y, por lo tanto, se obtiene una transferencia rápida de los compuestos entre la fase estacionaria y la móvil. La polaridad de la columna depende de la polaridad de los grupos funcionales unidos, que varía desde el octadecilsilano, relativamente no polar a grupos nitrilos muy polares.

Las fases estacionarias líquidas no unidas deben ser en gran medida inmiscibles con la fase móvil. Aún así, generalmente es necesario saturar previamente la fase móvil con la fase estacionaria para impedir la redisolución de la fase estacionaria de la columna. Las fases

estacionarias poliméricas recubiertas sobre el soporte son más duraderas.

Las columnas pueden calentarse para proporcionar separaciones más eficaces pero rara vez se las utiliza a temperaturas por encima de los 60° C, debido a la potencial degradación de la fase estacionaria o la volatilidad de la fase móvil.(13)

#### 7.2.2.2. Bomba

Los sistemas de bombeo de HPLC administran cantidades exactas de fase móvil desde los recipientes hasta la columna mediante una tubería y uniones adecuadas para altas presiones. (13)

Existen 3 tipos de bombas, cada una con sus propias ventajas y desventajas: bombas recíprocas, bombas de jeringa o desplazamiento y bombas neumáticas o de presión constante. (3)

#### 7.2.2.3. Inyectores

Después de ser disueltos en la fase móvil u otra solución apropiada, los compuestos que se van a cromatografiar se inyectan en la fase móvil, ya sean manualmente usando jeringas o inyectores de espiral o bien automáticamente mediante el uso de inyectores automáticos. Estos últimos constan de un carrusel o una gradilla para sostener los viales de muestra cuya parte superior se encuentra tapada con un septo o un perforable y un dispositivo de inyección para transferir las muestras desde los viales a un espiral conectado al cromatógrafo. Los inyectores automáticos pueden programarse para controlar el volumen de

muestreo, el número de inyecciones, y los ciclos de enjuague del espiral, el intervalo entre las inyecciones y otras variables operativas. (16)

#### 7.2.2.4. Detectores

La mayoría de métodos de HPLC usados actualmente requieren del uso de detectores espectrofotométricos. Este tipo de detector consta de una celda de flujo colocada en el extremo de la columna. Un haz de radiación UV pasa a través de la celda de flujo y se introduce en el detector. A medida que los compuestos eluyan de la columna, pasan a través de la celda y absorben la radiación lo que da lugar a cambios cuantificables en el nivel de energía. (13)

Existen detectores de longitud de onda fija, variable y múltiple; siendo el más utilizado los detectores de longitud de onda variable, porque permiten seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo, escogiendo la mayor absorción del analito. Para la investigación de desarrollo de técnicas analíticas se recomienda utilizar el detector de arreglo de diodos que emplea un conjunto de fotodiodos, para conseguir la luz transmitida en todo el espectro de absorción del eluido en tiempo real. (16)

Los detectores de longitud de onda variable contienen una fuente de luz continua, como una lámpara de deuterio o de xenón de alta presión y un monocromador o un filtro de interferencia para generar radiación monocromática a una longitud de onda seleccionada por el operador. (13)



Los detectores nos permiten ver y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

#### 7.2.2.5. Sistemas de toma y procesamiento de datos

Las estaciones de datos modernas reciben y almacenan la señal de los detectores e imprimen el cromatograma completo con las alturas y las áreas de los picos, la identificación de la muestra y las variables del método. Se emplean también para programar la cromatografía de líquidos, controlando la mayoría de las variables y proporcionando periodos largos de operación sin necesidad de supervisión. (13)

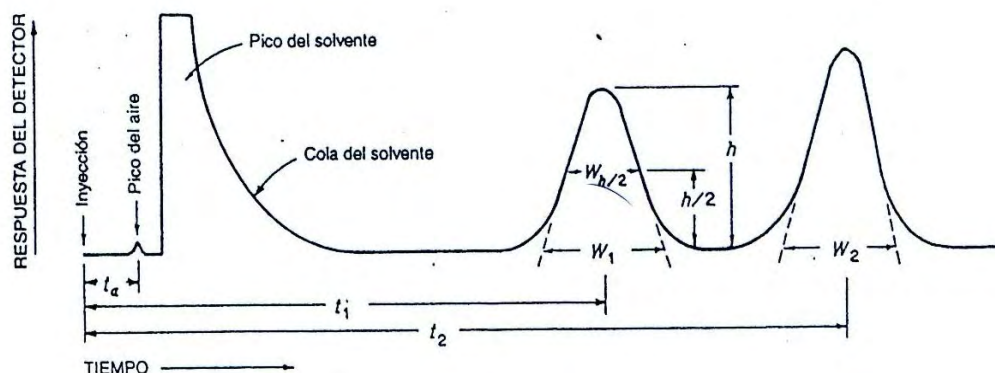
El resultado del ensayo cromatográfico es la obtención de fracciones separadas de un gráfico o cromatograma de cuya interpretación pueden extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas. (16)

#### 7.2.3. Aptitud del sistema

Las pruebas de aptitud del sistema son una parte integral de los métodos de cromatografía de líquidos. Se emplean para verificar que la sensibilidad de detección, la resolución y la reproducibilidad del sistema cromatográfico, son adecuadas para el análisis que se va a realizar. Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, los componentes electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras que deben analizarse constituyen un sistema integral que pueden evaluarse como tal. (13)

## Interpretación de cromatogramas

**Figura 1. Separación cromatográfica de dos sustancias**



La figura 1 representa una separación cromatográfica típica de dos sustancias, 1 y 2, donde  $t_1$  y  $t_2$  son los tiempos de retención respectivos,  $h$ ,  $h/2$ , y  $Wh/2$  son la altura, la mitad de la altura y el ancho a la altura media, respectivamente,  $W_1$  y  $W_2$  son los anchos respectivos de los picos 1 y 2 en la línea base. Los picos de aire son una característica de los cromatogramas de gases y corresponden al frente de la fase móvil en la cromatografía de líquidos.

Los tiempos de retención cromatográficos son característicos de los compuestos que representan pero no son únicos. (13)

La cantidad de platos teóricos ( $N$ ) es una medida de la eficiencia de la columna. Para los picos gaussianos se calcula por las ecuaciones:

$$N = 16 (t / W)^2 \text{ o } N = 5.54 (t / wh/2)^2$$

En donde  $t$  es el tiempo de retención de la sustancia y  $W$  es el ancho del pico de su base, obtenidos al extrapolar los lados relativamente rectos del pico hasta la base.  $Wh/2$  es el ancho del pico a la mitad de la altura, obtenido directamente por integradores electrónicos. El valor de  $N$  depende de la sustancia cromatografiada así como de las condiciones

operativas, como por ejemplo la fase móvil, la velocidad del flujo y la temperatura del gas transportador, la calidad del relleno, la uniformidad del relleno dentro de la columna y para, las columnas capilares, el espesor de la película en fase estacionaria, el diámetro interno y la longitud de la columna.

La separación de dos componentes en una mezcla, la resolución,  $R$  esta determinada por la ecuación:

$$R = 2 (t_2 - t_1) / w_2 + w_1$$

En donde  $t_2$  y  $t_1$  son los tiempos de retención de los 2 componentes, y  $w_2$  y  $w_1$  son los anchos correspondientes en las bases de los picos obtenidos al extrapolar los lados relativamente rectos de los picos hasta la línea base.

El área del pico y la altura del pico son generalmente proporcionales a la cantidad de compuesto eluido. Estos se miden generalmente mediante integradores electrónicos pero se pueden determinar mediante enfoques más clásicos. En general, se emplean las áreas de los picos pero pueden ser menos exactas si se producen interferencias. Para lograr un trabajo cuantitativo exacto, los componentes que se han de medir deben separarse de cualquier componente interferente. Se deben de evitar las asimetrías tanto en la parte anterior como en la posterior del pico y la medición de picos dentro de las colas de los disolventes. (13)

#### Establecimiento del método en cromatografía de líquidos

La cromatografía de líquidos de reparto es la más utilizada. En este tipo de cromatografía, el establecimiento del método tiende a ser más

complejo debido a que cuando la fase móvil es líquida, los componentes de la muestra interaccionan con ambas fases, la estacionaria y la móvil.

(3)

7.2.5.1. Selección de la columna.- Una buena cromatografía con fases móviles interactivas, requieren de un equilibrio adecuado entre las fuerzas intermoleculares existentes entre los 3 participantes activos en el proceso de la separación: el soluto, la fase móvil y la fase estacionaria. Estas fuerzas intermoleculares se describen cualitativamente en términos de polaridad relativa de cada uno de los reactivos. Las polaridades en orden creciente para varios grupos funcionales del analito son:

Hidrocarburos < éteres < ésteres < cetonas < aldehídos < amidas < aminas < alcoholes.

El agua es más polar que cualquier compuesto que contenga algunos de los anteriores grupos funcionales.

Al elegir una columna para una separación cromatográfica de reparto, la polaridad de la fase estacionaria debe ser bastante similar a la de los analitos, y para la elución se utilizan, entonces, una fase móvil con una polaridad considerablemente distinta. Este procedimiento por lo general resulta más adecuado que si las polaridades del soluto y de la fase móvil son parecidas pero difieren mucho con respecto a la fase estacionaria. En este caso, la fase estacionaria a menudo no puede competir efectivamente por los componentes de la muestra, y los tiempos de retención se hacen demasiado cortos para las aplicaciones prácticas. En

el otro extremo, por supuesto, se encuentra el caso en que las polaridades del soluto y la fase estacionaria sean demasiado parecidas y totalmente distintas de la fase móvil. En estas circunstancias, los tiempos de retención se hacen excesivamente largos.

En resumen, si se quieren obtener buenas separaciones en un tiempo razonable, las polaridades del soluto, de la fase móvil y de la fase estacionaria se han de armonizar cuidadosamente. Sin embargo, las teorías que relacionan las interacciones de la fase móvil y de la fase estacionaria con una serie determinada de componentes de una muestra son imperfectas, y en el mejor de los casos, un científico sólo puede elegir la fase estacionaria de manera general. Una vez hecha la elección, el científico ha de realizar una serie de ensayos tentativos obteniendo los cromatogramas con varias fases móviles hasta que se llegue a una separación satisfactoria. Si la resolución de todos los componentes de la mezcla resulta imposible, se ha de elegir otro tipo de columna. (3)

7.2.5.2. Selección de la fase móvil.- En cromatografía de líquidos el factor de capacidad  $k'$  se puede manipular fácilmente, debido a que este parámetro depende considerablemente de la composición de la fase móvil, todo esto con la finalidad de mejorar la resolución de una columna cromatográfica. Para una eficiencia optima,  $k'$  debería estar en el intervalo comprendido entre 2 y 5; sin embargo para mezclas complejas, ese intervalo se ha de extender tal vez de 0.5 a 20 para que todos los picos de los componentes tengan tiempo de aparecer.

El factor de capacidad  $k'$  puede modificarse cambiando el índice de polaridades disolvente. Este índice es una medida numérica de la polaridad relativa de varios disolventes.

**Tabla 1. Propiedades de las fases móviles cromatográficas más comunes**

Disolvente	Índice de refracción <sup>a</sup>	Viscosidad, cP <sup>b</sup>	Punto de ebullición, °C	Índice de polaridad, $P'$	Fuerza eluyente <sup>c</sup> , $\epsilon^0$
Fluoroalcanos <sup>d</sup>	1,27-1,29	0,4-2,6	50-174	< -2	-0,25
Ciclohexano	1,423	0,90	81	0,04	-0,2
n-Hexano	1,372	0,30	69	0,1	0,01
1-Clorobutano	1,400	0,42	78	1,0	0,26
Tetracloruro de carbono	1,457	0,90	77	1,6	0,18
i-Propiléter	1,365	0,38	68	2,4	0,28
Tolueno	1,494	0,55	110	2,4	0,29
Diétiléter	1,350	0,24	35	2,8	0,38
Tetrahidrofurano	1,405	0,46	66	4,0	0,57
Cloroformo	1,443	0,53	61	4,1	0,40
Etanol	1,359	1,08	78	4,3	0,88
Acetato de etilo	1,370	0,43	77	4,4	0,58
Dioxano	1,420	1,2	101	4,8	0,56
Metanol	1,326	0,54	65	5,1	0,95
Acetonitrilo	1,341	0,34	82	5,8	0,65
Nitrometano	1,380	0,61	101	6,0	0,64
Etilenglicol	1,431	16,5	182	6,9	1,11
Agua	1,333	0,89	100	10,2	Grande

<sup>a</sup> A 25 °C.

<sup>b</sup> El centipoise es una unidad típica de viscosidad; en unidades del SI, 1 cP = 1 mN · s · m<sup>-2</sup>.

En Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Multiplicando por 0,8 se tiene  $\epsilon^0$  en SiO<sub>2</sub>.

<sup>c</sup> Las propiedades dependen de la masa molecular. Se da un intervalo de datos.

La tabla 1 lista los índices de polaridad para varios disolventes que se utilizan en cromatografía de reparto. Obsérvese que el índice de polaridad varía de 10.2 para un compuesto muy polar como el agua hasta -2 para los fluoroalcanos muy poco polares. Cualquier índice de polaridad que se desee entre esos límites se puede conseguir por mezcla de dos disolventes adecuados. De este modo, el índice de polaridad  $P'_{AB}$  de una mezcla de disolventes A y B viene dado por:

$$P'_{AB} = \Phi_A P'_A + \Phi_B P'_B$$

Donde  $P'_A$  y  $P'_B$  son los índices de polaridad de los dos disolventes, y  $\phi_A$  y  $\phi_B$  son las fracciones de volúmenes de cada uno. Por lo común, un cambio de 2 unidades en  $P$  origina una variación de 10 veces en  $k'$ . Es decir, para una separación en fase inversa:

$$\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{(P'_2 - P'_1)/2}$$

Donde  $k'_1$  y  $k'_2$  son los valores inicial y final de  $k'$  para un soluto, y  $P'_1$  y  $P'_2$  son los correspondientes valores para  $P'$ . (3)

### 7.3. Calificación del Sistema

La calificación es la ejecución de pruebas para determinar si un componente de un proceso posee los atributos requeridos para trabajar correctamente y conducir verdaderamente a los resultados esperados. El significado de validación a veces se extiende para incorporar el concepto de calificación. (4)

La calificación del sistema es una premisa necesaria para poder validar. Para llevar a cabo la calificación se procede a la calibración del equipo y a la comprobación de métodos y sistemas. (17)

Las etapas de la calificación son:

A. Calificación del diseño (DQ).- Establecer y proveer evidencia documentaria que las premisas, los sistemas auxiliares, equipos y procesos han sido diseñados de acuerdo a los requerimientos de las Buenas Prácticas de Manufactura. (4)

B. Calificación de la Instalación (IQ).- Establecer con evidencia objetiva que todos los aspectos claves del proceso del equipo y sistemas auxiliares de la instalación se adhieren a la especificación aprobada del fabricante y que las recomendaciones del proveedor del equipo están consideradas convenientemente. (18)

C. Calificación operacional (OQ).- Establecer por límites objetivos del control del proceso de evidencia y niveles de acción que tienen como resultado al producto que reúne todos los requisitos predeterminados. (18)

D. Calificación del Performance (PQ).- Establecer por evidencia objetiva que el proceso, bajo condiciones anticipadas, produce constantemente un producto que reúne todos los requisitos predeterminados. (18)

#### 7.3.1. Calificación del HPLC

##### 7.3.1.1. Calificación de Instalación:

Pueden considerarse los siguientes datos:

- Nombre del equipo.
- Nombre del fabricante, modelo o tipo.
- Número de serie.
- Fecha en la fue recibido.
- Condiciones en la que recibido (nuevo o usado).
- Aspectos verificados para su aceptación de recepción.
- Fecha en la que el equipo fue puesto en servicio por el laboratorio (localización del equipo en el laboratorio).



- Instructivo de operación.
- Instructivo de mantenimiento. (17)

#### 7.3.1.2. Calificación Operacional:

Debe ser realizado por un técnico calificado.

**Tabla 2. Parámetros a evaluar en un sistema HPLC (17)**

Modulo	Parámetro	Importante para
Bomba	Reproducibilidad de flujo	Reproducibilidad / TR / A/H
	Precisión de gradiente	Transferencia del método
Inyector	Reproducibilidad	Precisión de resultados
	Residuo de muestra	Exactitud de precisión de resultados
Horno	Reproducibilidad de Temperatura	TR / A / H / forma de pico
Detector	Ruido	Sensibilidad
	Energía de lámpara	Sensibilidad
	Relación señal – ruido	Sensibilidad
	Precisión de longitud de onda	Sensibilidad, Transferencia de datos
	Linealidad	Precisión de resultados
Columna mas sistema completo	Forma de pico	Procesos de datos, identificación, reproducibilidad.
	Asimetría de pico	Procesos de datos, identificación, reproducibilidad.
	TR, resolución, platos teóricos	Procesos de datos, identificación, reproducibilidad.

#### 7.3.1.3. Calificación de Performance:

Es verificado por el usuario, trabajando con estándares certificados: por ejemplo metilparabeno. (17)

### 7.3.2. Calibración del Instrumental.

Los instrumentos de medida deben aportar datos fiables por lo que deben ser calibrados. (17)

La calibración es la comparación de un estándar de medida, o instrumento de exactitud conocida, con otro estándar o instrumento para detectar, correlacionar, reportar, y/o eliminar por ajuste cualquier variación en la exactitud del instrumento que está siendo comparado. (4)

### 7.3.3. Verificación de equipos

Es el examen que se efectúa a un instrumento para verificar el cumplimiento de sus especificaciones.

## 7.4. Método Analítico

### 7.4.1. Concepto

El método analítico se refiere a la forma de realizar el análisis. Este debe describir en detalle los pasos necesarios para realizar cada prueba analítica. Esta puede incluir a las preparaciones de la muestra, los estándares de referencia y los reactivos, uso de aparatos, generación de la curva de calibración, uso de la fórmula para los cálculos, etc.; pero no se limita sólo a ello. (19)

### 7.4.2. Fases en el desarrollo de un método analítico

El desarrollo lógico del método analítico transcurre en tres fases:

7.4.2.1. Definición de las características y requerimientos que debe satisfacer el método analítico: precisión exigible, sensibilidad deseable,

grado de selectividad, tiempo, coste, tipo de instrumentación necesaria, etc.

7.4.2.2. Puesta a punto del método analítico, desde los primeros estudios de tanteo con patrones hasta la utilización del método en muestras reales, pasando por la definición de los parámetros de idoneidad que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el método del análisis.

7.4.2.3. Validación del método analítico, esta tercera etapa permitirá conocer la fiabilidad del método para su aplicación rutinaria y, en combinación con las etapas anteriores, sus características de funcionamiento con consecuencias positivas para su rendimiento.  
(20)(21)

## 7.5. Validación de métodos analíticos

### 7.5.1. Concepto

Existen numerosas definiciones de Validación que expresan la misma idea, consideremos dos de ellas.

“Se llama Validación a la obtención de pruebas, convenientemente documentadas, demostrativas de que un método de fabricación o control es lo suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos”. (20)

Según USP, “la Validación de un método analítico es el proceso que establece mediante estudios en laboratorio, que las características del

desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas”. (13)

La validación es necesaria porque:

- Proporciona un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados.
- Permite un conocimiento profundo de sus características de funcionamiento.

Este conocimiento y seguridad en el método analítico que ha sido validado se traduce en:

- Disminución del número de fallos y repeticiones con el consiguiente ahorro de los costes asociados.
- Cumplimiento de los plazos previstos de análisis.
- Optimización del método, por ejemplo, mejorando la característica de practicidad y posibilidades de automatización.

Por otra parte, los métodos analíticos deben validarse para cumplir con las exigencias legales:

- El borrador de las normas de Buena Fabricación de Medicamentos de la CEE, en el capítulo de control de calidad, indica que los métodos de análisis deben estar validados.
- Las Good Manufacturing Practice de los Estados Unidos indican que deben establecerse y documentarse la exactitud, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de los métodos analíticos utilizados. (20)

#### 7.5.2. Tipos

##### 7.5.2.1. Validación Prospectiva

Se realiza cuando la verificación del cumplimiento de las condiciones establecidas para un proceso o método analítico se llevan a cabo antes de la comercialización del producto. Este tipo de validación se aplica cuando se elabora un nuevo método analítico. Es típico en los laboratorios de investigación y desarrollo, y se realiza de acuerdo con un protocolo perfectamente planificado. Comprende el estudio de todos los criterios necesarios para demostrar el buen funcionamiento del método. (17)

#### 7.5.2.2. Validación Retrospectiva

Se realiza cuando la idoneidad del método o proceso analítico se basa en la garantía constatada a través de los datos analíticos del producto ya comercializado, se aplica a métodos no validados previamente y de los que se tiene una amplia historia de resultados. (17)

#### 7.5.2.3. Revalidación

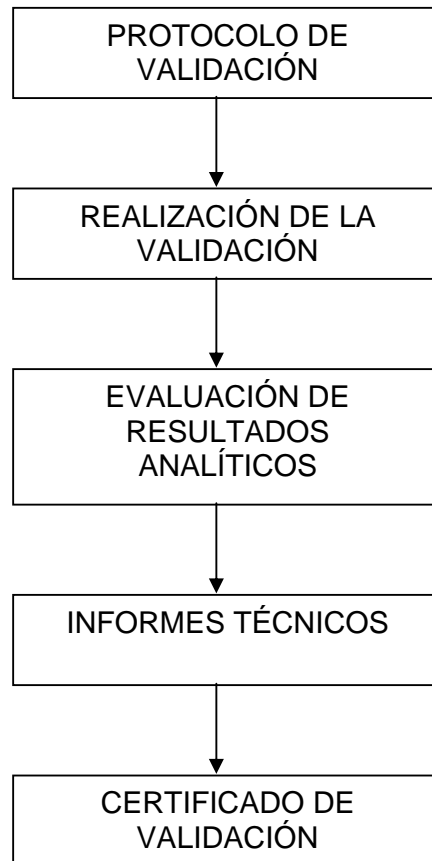
La introducción de un cambio que pueda afectar la idoneidad del método analítico establecido por la validación, podrá exigir una nueva validación, es decir una revalidación total o parcial de dicho método analítico. Los criterios a estudiar se deciden en función del tipo de cambio efectuado.

Entre los motivos que exige una nueva validación tenemos:

- Cambios importantes en la matriz del producto.
- Cambios importantes en el método analítico.
- Cambios en las especificaciones. (17)

### 7.5.3. Fases

El siguiente esquema resume las fases de que consta una Validación (20):



### 7.5.4. Características del desempeño analítico

#### 7.5.4.1 Exactitud

a) Definición: La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados de prueba obtenidos mediante este método y el valor verdadero. La exactitud de un método analítico debe establecerse en todo su intervalo. (13)

b) Determinación: En la valoración de un principio activo en un medicamento, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método a mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico (placebo) al que se hallan añadido cantidades conocidas de analito dentro del intervalo del método.(13)

Matemáticamente, la exactitud se expresa en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra o bien en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero.

Estadísticamente, suele efectuarse un test de “t” de Student para determinar si el valor medio hallado y valor considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado. (20)

Los documentos ICH recomiendan que se evalúe la exactitud realizando un mínimo de nueve determinaciones de tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado (es decir, tres concentraciones y determinaciones repetidas de cada determinación). (13)

#### 7.5.4.2. Precisión

a) Definición: La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el método repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad

del método analítico en condiciones normales de operación. En este contexto, la reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, por ejemplo en un estudio en colaboración. Una precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio. La repetibilidad se refiere a la realización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo de tiempo corto realizado por el mismo analista con el mismo equipo.

b) Determinación: La precisión de un método analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea, que permita calcular estadísticamente estimaciones válidas de la desviación estándar o de la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). Los análisis de este contexto son análisis independientes de muestras que se han llevado a cabo mediante el procedimiento analítico completo, desde la preparación de las muestras hasta el resultado final de las pruebas.

Los documentos ICH recomiendan que se evalúe la repetibilidad analizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración o un mínimo de seis al 100% de la concentración de prueba). (13)

#### 7.5.4.3. Especificidad o Selectividad



a) Definición: Los documentos de ICH definen especificidad como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.

Otras autoridades internacionales de reconocido prestigio (IUPAC, AOAC) han preferido el termino “selectividad“, conservando “especificidad” para procedimientos que resulten completamente selectivos. (13)

En esta monografía consideraremos los términos selectividad y especificidad como equivalentes.

La selectividad es una condición esencial para conseguir una buena exactitud por lo que es, en todos los casos, un criterio clave. Los estudios de selectividad o especificidad varían según el tipo de método analítico:

- Métodos de identificación. La selectividad debe demostrar que el método funciona en presencia de otras sustancias que pueden interferir y aquéllas de composición similar.
- Ensayos de pureza. La selectividad debe garantizar que el método analítico permite una evaluación de las impurezas que se pretenden analizar cualitativa o cuantitativamente. Si, por ejemplo, se trata de determinar impurezas o sustancias extrañas por cromatografía en capa fina, hay que demostrar que el método es capaz de separarlas todas de acuerdo a los límites de detección y/o cuantificación establecidos.

- Determinación cuantitativa de un componente. Cuando se determina la riqueza de una materia prima o el contenido en principio activo u otro componente (conservador, antioxidante) en un medicamento, el estudio de selectividad debe asegurar que la señal medida con el método analítico procede únicamente de la sustancia analizada sin interferencia de excipientes, productos de degradación y/o impurezas. (20)

b) Determinación: En análisis cualitativos (pruebas de determinación), debe demostrarse la capacidad de distinguir compuestos de estructura estrechamente relacionada cuya presencia resulta probable. Esta capacidad debería confirmarse mediante la obtención de resultados positivos a partir de muestras que contengan el analito quizá mediante comparación con un material de referencia conocido, junto con resultados negativos de muestras que no contengan dicho analito, y mediante la confirmación de que no se obtiene una respuesta positiva de materiales con estructura similar o estrechamente relacionada al del analito.

En un procedimiento analítico para impurezas, la especificidad puede establecerse mediante la adición al fármaco o producto farmacéutico de una cantidad conocida de impurezas en concentraciones adecuadas, y la demostración de que esas impurezas se determinan con exactitud y precisión adecuadas.

En una valoración, la demostración de especificidad requiere evidencia de que el procedimiento no resulte afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto puede hacerse agregando

al fármaco o producto farmacéutico una cantidad conocida de excipientes o de impurezas en concentraciones adecuadas, y demostrando que el resultado del análisis no ha sido afectado por la presencia de estos materiales extraños.

Los documentos de ICH afirman que cuando se utilizan los procedimientos cromatográficos, deberán presentarse cromatogramas representativos para demostrar el grado de selectividad y los picos deberán identificarse adecuadamente. (13)

#### 7.5.4.4. Sensibilidad, Limite de detección, Limite de cuantificación

a) Definición: Estos parámetros se relacionan con la cantidad de analito requerida para dar un resultado significativo, cualitativo o cuantitativo.

La sensibilidad es la capacidad de un método analítico de registrar ligeras variaciones en la concentración.

Debe distinguirse entre sensibilidad de calibrado y sensibilidad analítica.

La sensibilidad de calibrado es igual a la pendiente de calibración, es decir, la señal o respuesta por unidad de concentración o cantidad.

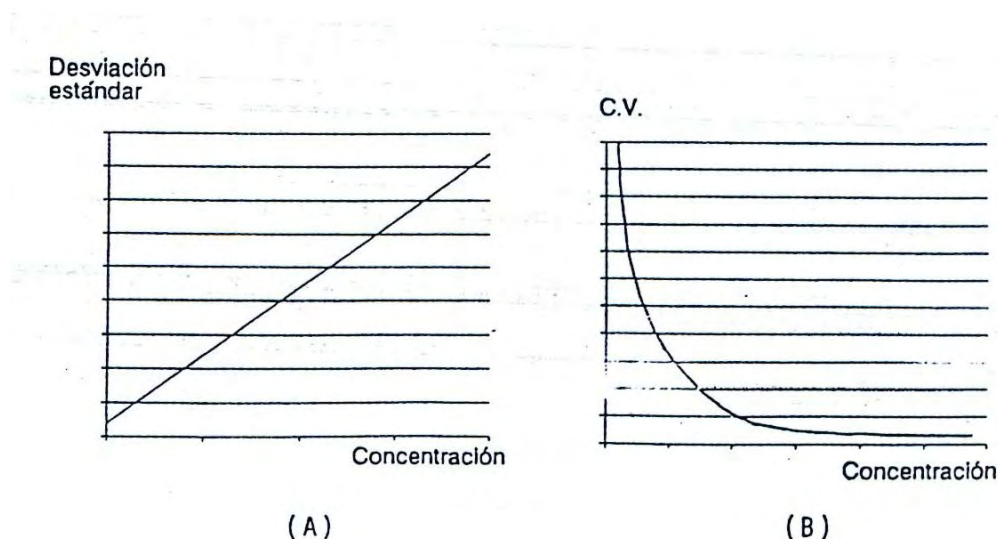
La sensibilidad analítica es la sensibilidad de calibrado dividida por la desviación estándar de la respuesta.

Dos técnicas pueden tener la misma sensibilidad de calibrado pero la sensibilidad analítica será mayor en la más precisa.

Mientras que la sensibilidad de calibrado es constante, dentro de un intervalo determinado, la sensibilidad analítica varía con la concentración del analito, puesto que la precisión cambia con la cantidad de analito presente en la muestra.

Si la precisión del método se expresa como desviación estándar se observa, generalmente, un incremento lineal de ésta al aumentar la concentración. Si, en cambio, se expresa como CV se observa una disminución no lineal al aumentar la concentración. (20)

**Figura 2: Relación entre concentración y desviación estándar (a) y coeficiente de variación (b) (20)**



El límite de detección, según la IUPAC, es la menor concentración o cantidad de analito detectable con razonable certeza por un procedimiento analítico dado. Es decir, es la cantidad o concentración mínima del analito a partir de la cual es factible realizar el análisis.

Según USP, el límite de detección es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas.

Un resultado “positivo” no es suficiente para que el analista considere detectado un analito. Se precisa, además, conocer el límite de detección

en las condiciones del método. De lo contrario, se puede incurrir en un falso positivo: suponer el analito presente en la muestra cuando de hecho no lo está.

El límite de detección es un parámetro analítico de gran interés en análisis de trazas, contaminantes y productos de degradación.

El límite de cuantificación o de determinación es, según la USP, la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas.

El límite de cuantificación es un término cuantitativo (menor cantidad medible) mientras que el límite de detección es cualitativo (menor cantidad detectable). (20)

b) Determinación: Para el límite de detección, en el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan ruido de fondo, los documentos de ICH describen un enfoque usual que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones de analito con las de muestra blanco. Se establece la concentración mínima a la que puede detectarse confiablemente un analito. Las relaciones señal-ruido habitualmente aceptables son de 2:1 ó 3:1. Otros enfoques dependen de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas. Independientemente del método utilizado, el límite de detección debería validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras preparadas al límite de detección o de las que se sabe se encuentran cerca de dicho límite.

Para el límite de cuantificación, en el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan ruido de fondo, los documentos de ICH describen un enfoque común que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones conocidas de analito con las de muestra blanco. Se establece la concentración mínima a la que puede cuantificarse confiablemente un analito. Una relación señal-ruido habitualmente aceptable es de 10:1. Otros enfoques dependen de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de la respuesta. Independientemente del método utilizado, el límite de cuantificación debería validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras de las que se sepa se encuentran cerca del límite de cuantificación o fueron preparadas a este límite. (13)

#### 7.5.4.5. Linealidad e Intervalo (Rango)

a) Definición: La linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales - ya sea de modo directo o por medio de una transformación matemática bien definida - a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado.

El intervalo o rango de un método analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo esos niveles), en la cual se puede determinar el analito en un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad, utilizando el método según se describe por escrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades

que los resultados de la prueba obtenidos mediante el método analítico (por ejemplo, porcentaje, parte por millón).

b) Determinación: la linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales como función de concentración de analito del contenido. Si al parecer existe una relación lineal, los resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos adecuados (por ejemplo, mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los cuadrados mínimos). En algunos casos para obtener la linealidad entre la respuesta de un analito y su concentración, es posible que haya que someter los datos de una prueba a una transformación matemática. Los datos obtenidos a través de la línea de regresión pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad. Se debería presentar el coeficiente de correlación, la intersección del eje de ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de los cuadrados residuales.

El intervalo o rango del método se valida verificando que el método analítico proporciona precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo, del mismo modo que dentro del intervalo.

La ICH recomienda que para establecer la linealidad se utilice normalmente un mínimo de 5 concentraciones. También recomienda que para la valoración de un fármaco (o de un producto terminado) se realice dentro del intervalo de 80% a 120% de la concentración de prueba. (13)

#### 7.5.4.6. Robustez

a) Definición: la robustez de un método analítico es una medida de su capacidad para no resultar afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal. (13)

#### 7.5.4.7. Tolerancia, Fortaleza o Resistencia

a) Definición: La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados de las pruebas obtenidos mediante el análisis de las mismas muestras en diversas condiciones, como por ejemplo en diferentes laboratorios, con diferentes analistas, instrumentos, lotes de reactivos, tiempo transcurrido durante la valoración, temperatura de valoración o días. La tolerancia se expresa normalmente como la carencia de influencia de las variables operativas y ambientales del método analítico sobre los resultados de las pruebas.

La tolerancia es una medida de la reproducibilidad de los resultados de las pruebas sometidas a la variación de condiciones que se esperarían normalmente entre distintos laboratorios o distintos analistas.

b) Determinación: La tolerancia de un método analítico se determina mediante el análisis de alícuotas de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, por diferentes analistas, utilizando condiciones operativas y ambientales que pueden ser diferentes, pero que continúan encontrándose dentro de los parámetros especificados del análisis. El grado de reproducibilidad de los resultados de la prueba se determina entonces como una función de las variables del análisis. Esa



reproducibilidad se puede comparar a la precisión de la valoración en condiciones normales para obtener una medida de la resistencia del método analítico. (13)

#### 7.5.5. Criterios de Validación a estudiar en función del tipo de método analítico

Según USP diferentes métodos de prueba requieren diferentes esquemas de validación.

Las categorías de los métodos de prueba se indican a continuación:

- a) Categoría I; métodos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.
- b) Categoría II; métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos métodos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.
- c) Categoría III; métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo, disolución, liberación del fármaco).
- d) Categoría IV; pruebas de identificación

Para cada categoría de análisis, se requiere diferente información analítica. En la tabla 3 se indican los elementos de datos que normalmente se requieren para cada una de las categorías de análisis.

**Tabla 3. Datos requeridos para la validación de los análisis**

Características de desempeño analítico	Categoría I de Valoración	Categoría II de Valoración		Categoría III de Valoración	Categoría IV de Valoración
		Prueba de Límite cuantitativa	Prueba de límite cualitativa		
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Límite de detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de cuantificación	NO	NO	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Intervalo	SI	SI	*	*	NO

(\*) Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

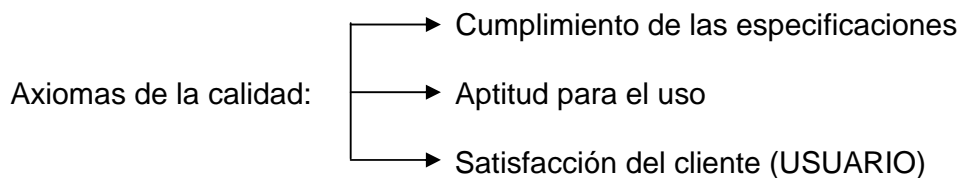
La validez de un método analítico puede verificarse sólo mediante estudios de laboratorio. Por lo tanto, la documentación de la finalización con éxito de dichos estudios constituye un requisito básico para determinar si un método es adecuado para sus aplicaciones previstas.

(13)

## 7.6. Calidad en la Industria farmacéutica

### 7.6.1. Calidad

Definimos calidad como la totalidad de aspectos y características de un producto, proceso o servicio, relacionados con su aptitud para satisfacer las necesidades establecidas o implícitas (22)



### 7.6.2. Control de Calidad

Se refiere al conjunto de técnicas y actividades operativas que se utilizan para verificar que se cumplen los requisitos de calidad establecidos. El concepto actual implica el control de materias primas, insumos, producto terminado, control de procesos, evaluación de proveedores, control de documentos, calibraciones, validaciones, control de productos post-venta, etc.

Es un área independiente de las demás y debe estar a cargo de personal calificado con adecuada experiencia y contar con recursos suficientes para garantizar que todas las decisiones tomadas se realizan en la práctica en forma confiable.

Este departamento debe proporcionar información desde el punto de vista analítico de todos los productos y materiales cualquiera sea su estado: cuarentena, aprobado, reanálisis, terminado, intermedio, estabilidad, almacenamiento, distribución, etc., empleando métodos analíticos completamente validados. (23)(24)

### 7.6.3. Aseguramiento de la calidad

Se refiere a acciones planificadas, documentadas y sistemáticas, que son necesarias para proveer adecuada confianza que un sistema, material o proceso, cumpla con los requisitos de calidad establecidos.

Para conseguir los objetivos de calidad es necesaria la existencia de un área de Aseguramiento de Calidad, que sin estar implicada directamente en todas las actividades, participa, interviene, gestiona y coordina, llevando a cabo la verificación de la calidad final de la producción

mediante el control de todos los pasos, normas, procesos, calidad de materias primas y materiales de acondicionamiento, selección de proveedores, evaluación final de toda la documentación correspondiente y finalmente efectuando la liberación del lote.

El área de Aseguramiento de Calidad es la encargada de todas aquellas acciones planificadas y sistemáticas necesarias para proveer adecuada confianza de que un material o proceso cumple con los requisitos de calidad establecidos.

Implementar y verificar el cumplimiento de los parámetros de calidad es una función del área de Aseguramiento de Calidad. Este es un concepto amplio, una filosofía de trabajo, que se refiere a todos los factores que afectan individual y colectivamente a la calidad de un producto, debiendo asegurar su elaboración niveles de calidad preestablecidos y adecuados a su uso. (23) (24)

#### 7.6.4. Gestión de la Calidad

Una gestión de calidad se refiere a la totalidad de las actividades programadas para asegurar que las medidas se aplican debidamente y sus resultados están adecuadamente documentados basándose en el estudio de las causas de los problemas, adoptando una actitud de prevención, actitud que se privilegia en sustitución de la práctica de la inspección para selección de lo aceptable y rechazo de los productos con desvíos. Planear lo que se va hacer, hacer lo que se planea y documentar lo que se hace.

Por otra parte, permite planificar estratégicamente las actividades enfatizando la prevención de problemas más que la detección después de ocurridos, asegurando el cumplimiento de BMP (GMP) y contribuyendo a la mejora continua por la acción correctiva de la retroalimentación.

La gestión de Calidad plantea las siguientes premisas:

- La calidad, seguridad y efectividad tienen que ser diseñadas y construidas con el producto.
- La calidad se construye, no debe ser inspeccionada o verificada después que el producto está terminado.
- Cada etapa del proceso de elaboración debe estar bajo control para garantizar un producto final aceptable.
- Todo proceso que siga el siguiente esquema, presenta una mejora continua, generada por la retroalimentación.

El titular de una autorización de elaboración debe fabricar los medicamentos asegurando que los mismos son adecuados para el uso previsto, cumplen los requisitos de la autorización de comercialización y no exponen a los pacientes a riesgos debidos a defectos en la seguridad, calidad o eficacia. El logro de este objetivo de calidad es responsabilidad de la dirección de la empresa y exige la participación y el compromiso de todo el personal de la misma. (23) (24)

#### 7.6.5. Sistema de Garantía de Calidad

También llamado Sistema de Gestión de Calidad, es el conjunto de elementos mutuamente relacionados o que interactúan con el fin de

establecer políticas y objetivos para dirigir y controlar una organización con respecto a la calidad.

El sistema de garantía de calidad debe incluir:

**Estructura organizacional**

- Procedimientos.
- Procesos.
- Recursos.

El sistema de garantía de calidad es responsable de aprobar y seguir las actividades de validación:

- Métodos analíticos.
- Procesos.
- Sistemas de apoyo (23) (24).

**7.6.6. Normativa Internacional**

ISO 9000: Es una norma internacional que define los conceptos principales de garantía de calidad (QA/QC) y provee guías para la selección de estándares apropiados, que aseguren el cumplimiento de contratos que pueden ser utilizados para actividades asociadas con calidad.

ISO 9001: Diseño, desarrollo, producción, instalación y servicio

ISO 9002: Producción e instalación

ISO 9003: Inspección y ensayo

ISO 9000 / 9004: Guías de definiciones y apoyo

ISO 17025 (Guía ISO 25): Norma internacional que define los requerimientos mínimos de implementación y competencia de los laboratorios de calibración y análisis.

ICH (Conferencia Internacional de Armonización): Buenas Prácticas de Laboratorio (BLP).

CFR Título 21, sección 58 (EEUU): Establece regulaciones y requisitos para ensayos de laboratorio no clínicos. (23) (24)

#### 7.6.7. Buenas Prácticas de Manufactura

En general, son un conjunto de normas que cada laboratorio farmacéutico debe poner en práctica con el fin de asegurar la calidad de los productos que fabrique, debiendo para ello tomar todas las medidas oportunas para garantizar que los medicamentos posean la calidad necesaria según el uso al que se destinen.

Este conjunto de medidas es muy amplio, abarcando las normas que deben afectar al personal, locales, maquinarias, instalaciones, materias primas, producto terminado, fabricación, control de calidad, documentación y expedición de las especialidades.

Dicha normativa establece que todas las operaciones, procesos, métodos o técnicas, deben estar reguladas o escritas y deben ser cumplidas y supervisadas. (25)

#### 7.6.8. Buenas Prácticas de Laboratorio

Están relacionadas con la realización, procesos y condiciones bajo las que se planifican, realizan, controlan, registran e informan los estudios

de los laboratorios. Las BPL pretenden promocionar la calidad y validez de los datos de análisis. Es decir, si el trabajo experimental se dirige cumpliendo las BPL, debería ser posible para un inspector observar los registros del trabajo y determinar fácilmente, por qué, cómo y por quién se realizó el trabajo, quién llevaba el control, qué equipamiento se utilizó, cuáles fueron los resultados obtenidos, qué problemas aparecieron y cómo fueron resueltos. Las BPL sirven para asegurar la validez de los estudios. (25), (26)

## VIII. PARTE EXPERIMENTAL

### A. DESARROLLO DE LA TÉCNICA ANALITICA

Se realizó una investigación bibliográfica y virtual no encontrándose ningún antecedente publicado de una técnica de análisis de tabletas que contengan la asociación de los principios activos de clonixinato de lisina y pargeverina clorhidrato.

Las materias primas usadas en el lote piloto del presente trabajo se cuantificaron con el método de volumetría en medio no acuoso según técnica del proveedor de dichos insumos. Por lo que una vez realizado el piloto del producto nuevo en cuestión se procedió al desarrollo de la técnica.

Para establecer la longitud de onda de análisis de los analitos, se tuvo en cuenta la similitud de los grupos funcionales de la pargeverina clorhidrato con los del bromuro n-butil hioscina. Ambos principios activos poseen una amina terciaria en su composición. El bromuro n-butil



hioscina según técnica propia del laboratorio se analiza a 245 nm, lo cual nos permitió ensayar con dicha longitud de onda.

Para determinar el solvente más apropiado se tuvieron en cuenta las solubilidades de los analitos. La pargerverina clorhidrato y el clonixinato de lisina son sustancias solubles en agua, metanol y sustancias ligeramente ácidas.

Debido a que los principios activos son de naturaleza más polar, se seleccionó una fase móvil compuesta por solventes polar y medianamente polar, como agua y metanol; y para lograr el apareamiento iónico se utilizó el lauril sulfato de sodio.

Para la elección de la columna cromatográfica se escogió una RP Select B, cuyo relleno se encuentra compuesto de octilsilano unido químicamente a sílice porosa de 5-10  $\mu\text{m}$  de diámetro, de naturaleza no polar. De esta manera los tres componentes quedarán armonizados y los tiempos de retención serán cortos.

Con estas premisas se ensayó en el sistema inyectando muestras de estándares de clonixinato de lisina y pargerverina clorhidrato, obteniéndose picos de absorbancia.

Se inyectó en el sistema con muestras de tabletas a concentraciones similares observándose cromatogramas con picos de absorbancia con tiempos de retención y áreas similares a las muestras de estándares. Asimismo, se comparó con cromatogramas de fase móvil, placebo de excipientes, solventes, no detectándose respuesta alguna en los mismos tiempos de retención.

En el caso del clonixinato de lisina se recuperó el 100%.

En el caso de la pargeverina clorhidrato la absorbancia no era cuantificable debido a su baja concentración en la tableta por lo que se optó por inyectar un volumen de muestra mayor: 100  $\mu$ l, siendo el inicial de 5  $\mu$ l.

Para demostrar la validez del método se procedió con la validación.

## **B. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN**

### **8.1. MATERIALES, EQUIPOS, REACTIVOS, ESTÁNDARES Y MUESTRAS:**

#### **Materiales:**

- Columna cromatográfica
- Embudo de vidrio
- Espátulas
- Fiolas de 10ml, 100ml, 200ml y 250ml
- Frascos de fase móvil de 1000 ml
- Jeringas descartables de 5 ml
- Matraz de kitasato de 1000ml
- Membranas filtrantes de nylon de 0.5  $\mu$ m. y 25 mm. de diámetro
- Mortero y pilón
- Pipetas graduadas de 5ml y 10ml
- Pipetas volumétricas de 4 ml, 5ml, 15ml y 20ml
- Probetas de 1000ml
- Vasos de precipitación de 1000 ml
- Viabes de 1ml para HPLC

**Equipos:** los equipos utilizados en la presente validación han sido calibrados y calificados, y se detallan a continuación:

- Agitador de fiolas

Marca: BURELL

Modelo: 75

Serie: 016028

- Balanza analítica

Marca: OHAUS

Modelo: V12140

Serie: G2761121381998P

- Bomba de vacío

Marca: GENERAL ELECTRIC/MILLIPORE

Modelo: 5KH33EN25T

Serie: 0780

- Cromatógrafo líquido de alta resolución

Marca: MERCK LAHCROM

Modulo:	Modelo:	Serie
Bomba	L-7100	1392-O27
Inyector automático	L-7200	1383-O12
Horno	L-7300	1385-O16
Detector UV visible	L-7420	1350-O26

- Purificador de agua

Marca: Milli-Q gradiente/MILLIPORE

Modelo: F4HN68318

Serie: QGARDOOD2

- Ultra sonido  
Marca: BRANSON  
Modelo: 3510  
Serie: RMC050025187E

**Reactivos:**

- Ácido clorhídrico QP
- Agua calidad HPLC
- Lauril sulfato de sodio GR
- Metanol grado HPLC

**Estándares**

- Estándar secundario Clonixinato de Lisina (ver anexo 2)  
Lote: 0019996  
Fecha de Expira: Marzo-2008  
Potencia tal cual: 97,67%
- Estándar secundario Pargeverina Clorhidrato (ver anexo 3)  
Lote: 0118945  
Fecha de Expira: Mayo-2008  
Potencia tal cual: 101,12%

**Muestra:**

- Piloto de tabletas recubiertas de Clonixinato de Lisina 125 mg y  
Pargeverina Clorhidrato 10 mg  
Lote: E-27002

## 8.2. MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

### 8.2.1. Condiciones cromatográficas

- Equipo: Cromatógrafo líquido de alta resolución
- Columna: RP Select B 5  $\mu$ m 125 x 4 mm
- Sistema: isocrático
- Longitud de onda: 245 nm
- Temperatura: 25 °C
- Flujo: 1.5 ml/min
- Volumen de inyección
  - Para clonixinato de lisina: 5  $\mu$ l
  - Para pargeverina clorhidrato: 100  $\mu$ l
- Tiempo de retención:
  - Para clonixinato de lisina: aproximadamente 1,9 min.
  - Para pargeverina clorhidrato: aproximadamente 8 min.
- Método de cálculo: estándar externo

### 8.2.2. Preparación de la fase móvil:

#### 8.2.2.1. Preparación de Ácido Clorhídrico 0,001 N:

Medir en una fiola de un litro 85 ml. de ácido clorhídrico QP y llevar a volumen con agua. Tomar 1 ml. de la solución anterior en una fiola de un litro y llevar a volumen con agua.

#### 8.2.2.2. Preparación de la fase móvil:

En una probeta medir 370 ml. de ácido clorhídrico 0,001 N y llevar a un recipiente de un litro. Añadir 2 g de lauril sulfato de sodio y agitar hasta

disolver. Medir en un probeta 680 ml. de metanol y mezclar con la solución anterior. Filtrar la fase móvil al vacío.

#### 8.2.2.3. Preparación de la soluciones de trabajo:

##### a) Para Clonixinato de Lisina:

Todas las soluciones del estándar y de la muestra serán diluidas con una solución de metanol: agua en proporción 1:1.

##### b) Para Pargeverina Clorhidrato

Todas las soluciones del estándar y de la muestra serán diluidas con una solución de ácido clorhídrico 0,01 N., que se prepara tomando 10 ml de ácido clorhídrico 1N en una fiola de 1000 ml y llevando a volumen con agua.

### 8.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

#### 8.3.1 Aptitud del Sistema:

##### 8.3.1.1. Para Clonixinato de Lisina:

##### a) Precisión

##### a. 1) Método Operatorio:

Preparar el estándar al 100%.

Pesar exactamente alrededor de 125 mg de clonixinato de lisina estándar en una fiola de 250 ml. Añadir aproximadamente 100 ml de solución diluyente correspondiente, agitar con magneto por 20 minutos.

Enrasar, homogenizar y filtrar. Inyectar en el sistema por 7 veces.

##### a. 2) Cálculo Estadístico:

La precisión se expresa matemáticamente calculando la dispersión de los datos respecto a la media.

A. Desviación estándar (s):

Se calcula con la siguiente fórmula (27):

$$s = \sqrt{\frac{(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Donde:

n: Número de muestras.

y: área del pico

B. Desviación estándar relativa (rsd) o coeficiente de variación (cv):

Se calcula con la siguiente fórmula (27):

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$$

$\bar{y}$  : promedio de las áreas del pico

**Criterio de aceptación:** máximo 2%

a.3) Resultados:

**TABLA 4. PRECISION DEL SISTEMA CON EL ESTANDAR CLONIXINATO DE LISINA**

Nº de inyección	Areas	Tiempos
1	2233,32935	1,930
2	2231,53540	1,928
3	2233,98535	1,927
4	2235,26685	1,925
5	2237,95728	1,925
6	2238,33374	1,928
7	2238,57715	1,929
<b>PROMEDIO</b>	2235,56930	1,927
<b>RSD %</b>	0,12	0,10

b) Linealidad

b. 1) Método Operatorio:

Preparar concentraciones del estándar al 50, 75, 100, 125 y 150 % por triplicado cada concentración.

- Estándar al 50%:

Pesar exactamente alrededor de 62.5 mg de estándar en una fiola de 250 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Estándar al 75 %:

Pesar exactamente alrededor de 93.75 mg de estándar en una fiola de 250 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Estándar al 100 %:

Pesar exactamente alrededor de 125 mg de estándar en una fiola de 250 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Estándar al 125 %:

Pesar exactamente alrededor de 156.25 mg de estándar en una fiola de 250 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Estándar al 150 %:

Pesar exactamente alrededor de 187.5 mg de estándar en una fiola de 250 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

Injectar en el sistema en orden creciente.



b. 2) Cálculo Estadístico:

A. Cálculo de la recta de regresión.

Se determina la curva de regresión, para el caso de una recta la función toma la forma (27):

$$y = bx + a$$

Donde:

x: : concentración o cantidad de analito (variable independiente).

y : área del pico (variable dependiente).

b: valor de la pendiente (indica la sensibilidad del método).

a: ordenada de origen (intercepto)

Fórmula para hallar “a”

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

Fórmula para hallar “b”

$$b = \frac{\frac{\sum xy - \sum x \sum y}{n}}{\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2}{n}}$$

n: Número de muestras.

B. Interpretación estadística de la regresión lineal

- Coeficiente de correlación (r)

Se determina para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto:

$y = bx + a$ ; refleja el grado de relación o ligazón entre las concentraciones (x) y su respuesta (y) (27).

Formula para hallar “r”:

$$r = \frac{\frac{\sum xy - \sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left[ \frac{\sum x^2 - (\sum x)^2}{n} \right] \left[ \frac{\sum y^2 - (\sum y)^2}{n} \right]}}$$

Si:

$r = 1$ : indica una recta perfectamente igual

$r = -1$ : indica una recta perfectamente lineal negativa

$r = 0$  indica que no hay correlación entre x e y

**Criterio de aceptación:** mínimo 0,995

- Coeficiente de determinación ( $r^2$ )

Del derivado del coeficiente de correlación se calcula el coeficiente de determinación " $r^2$ ", que indica el grado de ajuste de la ecuación.

**Criterio de aceptación:** mínimo 0,99

Sin embargo, el mejor indicativo del modelo lineal no es " $r$ " sino un test estadístico.

- Test Estadístico para el coeficiente de correlación ( $r$ )

En el cual se calcula el valor de  $t_{\text{regresión}}$  (test de regresión) con  $n-2$  grados de libertad y un intervalo de confianza de 95% ( $\alpha = 0,05$ , donde  $\alpha$  es probabilidad de cometer error, y  $1 - \alpha$  es grado de confianza), se compara con el valor de  $t_{\text{tabla}}$  (test tabulado) (Ver anexo 4) para el nivel de confianza requerido. (27)

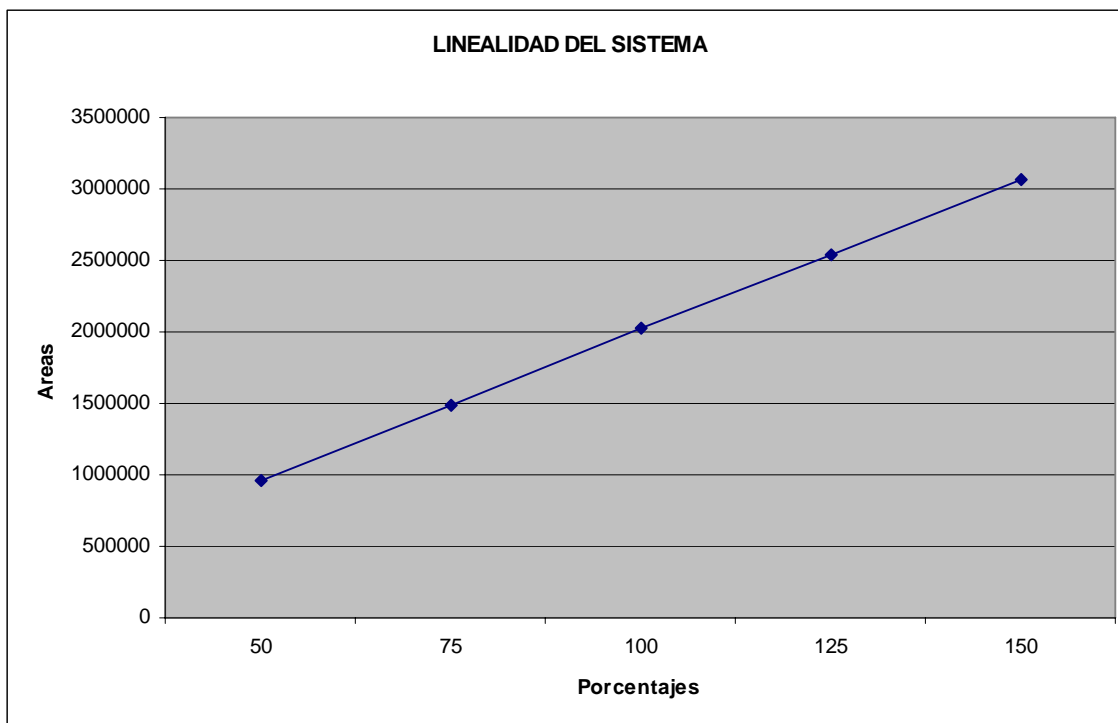
Fórmula para hallar  $t_r$

$$t_{\text{regresión}} = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

**Criterio de aceptación:** Si el valor de  $t_{\text{regresión}}$  es mayor a  $t_{\text{tabla}}$ , existe una correlación lineal significativa entre x e y ( $r \neq 0$ ).

b.3) Resultados:





#### 4.3.1.2. Para Pargeverina Clorhidrato:

##### a) Precisión:

##### a.1) Método Operatorio:

Preparar el estándar al 100%.

Pesar exactamente alrededor de 20 mg de pargeverina clorhidrato estándar en una fiola de 100 ml. Añadir aproximadamente 50 ml de solución diluyente correspondiente, agitar hasta disolver, enrasar y homogenizar. Tomar 5 ml de la solución anterior en una fiola de 10 ml y llevar a volumen. Homogenizar y filtrar.

Injectar en el sistema por 7 veces

##### a.2) Cálculo Estadístico:

Calcular de la misma manera que lo especificado en el punto 4.3.1.1. a.2

**Criterio de aceptación:** RSD máximo 2%

a.3) Resultados:

**TABLA 6. PRECISION DEL SISTEMA CON EL ESTANDAR DE PARGEVERINA CLORHIDRATO**

Nº de inyección	Areas	Tiempos
1	828,10260	8,036
2	827,25897	8,033
3	827,38519	8,017
4	830,13629	8,026
5	828,57861	8,033
6	826,99371	8,024
7	827,43536	8,033
<b>PROMEDIO</b>	827,98439	8,029
<b>RSD %</b>	0,13	0,08

b) Linealidad

b.1) Método Operatorio:

Preparar concentraciones del estándar al 40, 80, 100, 120 y 160 % por triplicado cada concentración.

- Preparación de solución madre:

Pesar exactamente alrededor de 20 mg de pargeverina clorhidrato estándar en una fiola de 100 ml, y llevar a volumen, realizando el tratamiento correspondiente.

- Estándar al 40%:

Tomar 5 ml de la solución madre en una fiola de 25 ml, llevar a volumen con la solución diluyente, homogenizar y filtrar.

- Estándar al 80 %:

Tomar 4 ml de la solución madre en una fiola de 10 ml, llevar a volumen con la solución diluyente, homogenizar y filtrar.

- Estándar al 100 %:

Tomar 5 ml de la solución madre en una fiola de 10 ml, llevar a volumen con la solución diluyente, homogenizar y filtrar.

- Estándar al 120 %:

Tomar 15 ml de la solución madre en una fiola de 25 ml, llevar a volumen con la solución diluyente, homogenizar y filtrar.

- Estándar al 160 %:

Tomar 20 ml de la solución madre en una fiola de 25 ml, llevar a volumen con la solución diluyente, homogenizar y filtrar.

Injectar en el sistema en orden creciente.

b.2) Cálculo Estadístico: Calcular de la misma manera que lo especificado en el punto 4.3.1.1. b.2

**Criterios de aceptación:**

"r" "mínimo 0,995

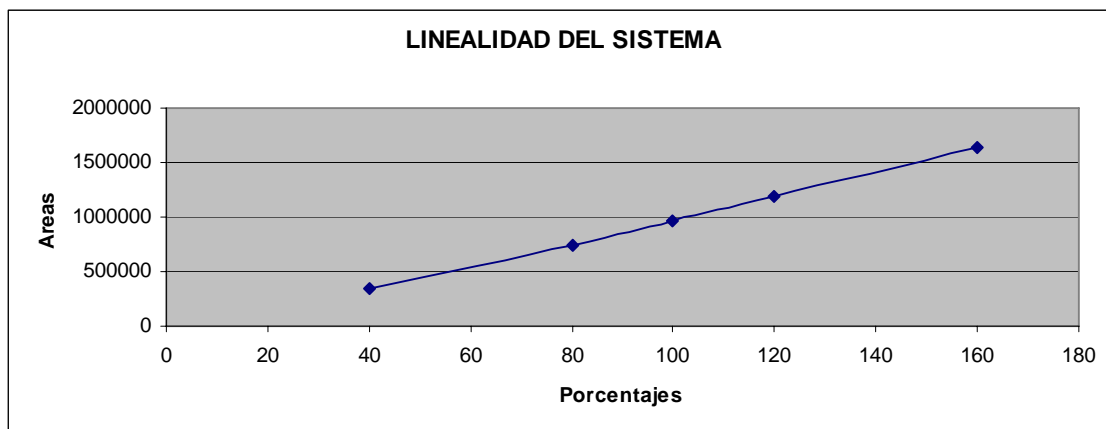
"r<sup>2</sup>" mínimo 0,99

t<sub>regresión</sub> mayor a t<sub>tabla</sub>

b. 3) Resultados:







### 8.3.2 Parámetros de Desempeño

#### 8.3.2.1. Para Clonixinato de Lisina:

##### a) Selectividad

##### a.1) Método Operatorio:

Preparar el estándar al 100%.

Pesar exactamente alrededor de 125 mg de clonixinato de lisina estándar en una fiola de 250 ml. Añadir aproximadamente 100 ml de solución diluyente correspondiente, agitar hasta disolver. Enrasar, homogenizar y filtrar. Inyectar en el sistema una vez.

Preparar placebo más principio activo al 100%.

Preparar una solución de placebo de excipientes pesando 135 mg de polvo en una fiola de 250 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente e inyectar en el sistema.

Pesar exactamente alrededor de 125 mg de clonixinato de lisina estándar y 135 mg de placebo de excipientes en una fiola de 250 ml. Añadir aproximadamente 100 ml de solución diluyente correspondiente,

agitar hasta disolver. Enrasar, homogenizar y filtrar. Inyectar en el sistema una vez.

Inyectar también solución diluyente y fase móvil.

a.2) Resultados: (Ver anexo 5 y 6)

**TABLA 8. SELECTIVIDAD DEL MÉTODO DE CLONIXINATO DE LISINA**

Sustancia Tratada		Evaluado en el método	Condiciones	Resultados
Estándar	al 100%	Sí	*	Si hay respuesta aprox. al 1,9 minutos
Placebo	Excipientes	Sí	*	No hay respuesta
Placebo + p.a.	Al 100%	Sí	*	Si hay respuesta aprox. al 1,9 minutos
Solvente	Metanol: agua (50:50)	Sí	*	No hay respuesta
Fase móvil	HCl 0,001 N: Metanol (37:68)+ 2g LAURIL SULFATO	Sí	*	No hay respuesta

\* Las que se señalan en la parte experimental

b) Exactitud

b.1) Método Operatorio:

Inyectar en el sistema 7 inyecciones de solución estándar del clonixinato de lisina al 100%, preparado como se indico en la precisión del sistema.

Preparar soluciones de clonixinato de lisina QP añadiéndole placebo de excipientes en concentraciones al 80%, 100% y 120% por triplicado e inyectar en el sistema cada solución.

- Solución al 80%:

Pesar exactamente alrededor de 100 mg de clonixinato de lisina QP y 160 mg de placebo de excipientes en una fiola de 250 ml, y

llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Solución al 100%:

Pesar exactamente alrededor de 125 mg de clonixinato de lisina QP y 135 mg de placebo de excipientes en una fiola de 250 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Solución al 120%:

Pesar exactamente alrededor de 150 mg de clonixinato de lisina QP y 110 mg de placebo de excipientes en una fiola de 250 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

#### b.2) Cálculo Estadístico:

Determinar los siguientes parámetros estadísticos:

A. Cálculo del porcentaje de recuperación de cada concentración:

**Criterio de aceptación:** 98% -102%

B. Cálculo de la Desviación estándar (s):

Calcular de la misma manera que lo especificado en el punto 4.3.1.1. a.2

A.

C. Desviación estándar relativa (rsd) o coeficiente de variación (cv):

Calcular de la misma manera que lo especificado en el punto 4.3.1.1. a.2

B.

**Criterio de aceptación:** RSD máximo 2%

D. Cálculo del “t” de student :

Suele efectuarse un test de “t” student para determinar su valor medio hallado y el valor considerado verdadero y el valor considerado verdadero no difiere significativamente para un grado de probabilidad determinado.

Determinar con la siguiente fórmula:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{CV}$$

Donde:

R = porcentaje de recuperación

n= número de determinaciones

CV = coeficiente de variación

**Criterio de aceptación:**

Si  $t_{\text{exp}}$  es menor que  $t_{\text{tabla}}$  (ver anexo 4) para el riesgo escogido, generalmente  $p = 0.05$  y  $n-1$  grado de libertad, significa que ambos valores no son estadísticamente diferentes y que el método analítico tiene la exactitud requerida.

Si  $t_{\text{exp}}$  es mayor que  $t_{\text{tabla}}$  significa que el método analítico no es exacto y que existe un error sistemático por defecto o por exceso, que en valor absoluto es  $|100 - R|$ .

b.3) Resultados:

**TABLA 9. EXACTITUD DEL METODO DE CLONIXINATO DE LISINA**

**Estandar de referencia**

Nombre                    CLONIXINATO DE LISINA  
 Peso                      123,26

N° de Inyección	Areas	Amount
1	2233,32935	0,055191143
2	2231,53540	0,055235512
3	2233,98535	0,055174937
4	2235,26685	0,055143304
5	2237,95728	0,055077012
6	2238,33374	0,055067749
7	2238,57715	0,055061761
Promedio	2235,56930	0,055135917
RSD %	0,12	0,12

**DILUCIONES**

Estandar                    0,055135917  
 De Referencia              250

FACTOR St :    0,000220544

Muestras                    250  
 Peso (mg)

FACTOR mp :            250

PORCENTAJE TEORICO	CANTIDAD AGREGADA (mg)	AREAS	CANTIDAD ENCONTRADA (mg)	PORCENTAJE RECUPERADO
<b>Exactitud 80%</b>	103,2	1848,06677	101,89	98,74
	102,3	1863,07349	102,72	100,41
	102,9	1877,63428	103,53	100,61
<b>Exactitud 100%</b>	127,3	2340,11963	129,02	101,35
	126,1	2373,03296	130,84	103,76
	127,5	2348,54736	129,49	101,56
<b>Exactitud 120%</b>	155,9	2831,28687	156,11	100,13
	156,4	2827,71582	155,91	99,69
	155,8	2894,51025	159,59	102,43
<b>PROMEDIO</b>				100,96
<b>RSD %</b>				1,49

T exp                    1,936804059  
 T tabla                    2,306

c) Precisión o Repetibilidad

c.1) Método Operatorio:

Injectar en el sistema 7 inyecciones de solución estándar del clonixinato de lisina al 100% preparado como se indico en la precisión del sistema.

Moler 20 tabletas de la muestra en un mortero. Pesar exactamente alrededor de 260 mg de polvo en una fiola de 250 ml y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

Preparar por sextuplicado e injectar por duplicado en el sistema.

c.2) Cálculo Estadístico:

Calcular de la misma manera que lo especificado en el punto 4.3.1.1. a.2

**Criterio de aceptación:** RSD máximo 2%

c.3) Resultados:

**TABLA 10. PRECISION DEL METODO CON LA MUESTRA: REPETIBILIDAD DE CLONIXINATO DE LISINA**

Estándar de referencia			
Nombre		Clonixinato de Lisina	
Potencia %		97,67%	
Peso (mg)	ST	126,2	
N° de Inyección	Areas	Factor st	
1	2233,32935	0,05650756	
2	2231,53540	0,05655299	
3	2233,98535	0,05649097	
4	2235,26685	0,05645858	
5	2237,95728	0,05639071	
6	2238,33374	0,05638123	
7	2238,57715	0,05637510	
Promedio		2235,56930	
RSD %		0,1242343	

**DILUCIONES**

**Estandar**                       $\frac{0,05645}{250} \times 97,67\%$   
    FACTOR St                      0,000220543

**Muestras**                       $\frac{250}{Pmp}$

FACTOR MP  
PESO PROMEDIO DE MUESTRA

250  
260,20

N ° de muestra	PESO (mg)	AREA	mg/tableta
1	261,7	2315,8418	126,953722
		2321,50757	127,264318
2	261,5	2309,83618	126,721340
		2314,79321	126,993291
3	261,6	2334,62378	128,032268
		2340,83008	128,372625
4	261,7	2297,79224	125,964251
		2301,67114	126,176891
5	261,8	2327,81421	127,561302
		2334,8811	127,948559
6	261,4	2330,81982	127,921455
		2335,97705	128,204497
		PROMEDIO	127,34
		RSD	0.62

#### d) Precisión Intermedia

##### d.1) Método Operatorio:

Dos analistas en diferentes días realizarán el ensayo, cada uno debe inyectar en el sistema 5 inyecciones de solución estándar del clonixinato de lisina al 100%, preparado como se indico en precisión del sistema.

Moler 20 tabletas de la muestra en un mortero. Preparar soluciones de muestra en concentraciones al 80%, 100% y 120% e inyectar en el sistema por duplicado cada solución.

##### - Solución al 80%:

Pesar exactamente alrededor de 208 mg de muestra en una fiola de 250 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

##### - Solución al 100%:

Pesar exactamente alrededor de 260 mg de muestra en una fiola de 250 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Solución al 120%:

Pesar exactamente alrededor de 312 mg de muestra en una fiola de 250 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

#### d.2) Cálculo Estadístico

Calcular de la misma manera que lo especificado en el punto 4.3.1.1. a.2 para los resultados de los dos analistas.

**Criterio de aceptación:** RSD máximo 2%

#### d.3) Resultados

**TABLA 11. PRECISION INTERMEDIA DEL METODO DE CLONIXINATO DE LISINA**

##### Estándar de referencia

<b>Nombre</b>	Clonixinato de Lisina
<b>Potencia %</b>	97,67%
<b>Peso (mg)</b>	
st 1º analista	125,7
st 2º analista	126,9

1º ANALISTA		2º ANALISTA	
Areas	Factor de st	Areas	Factor de st
2356,74658	0,05334	2283,52441	0,05557
2365,46118	0,05314	2283,32886	0,05558
2360,12524	0,05326	2284,62402	0,05555
2360,09766	0,05326	2283,30225	0,05558
2361,08960	0,05324	2290,02905	0,05541
<b>Promedio</b>	0,05325	<b>Promedio</b>	0,05554
<b>rsd %</b>	0,13	<b>rsd %</b>	0,13

##### Diluciones

Estándar	<u>0,053246902</u>	x $\frac{1}{1}$	x <u>0,9767</u>
De Referencia	250		
<b>FACTOR St 1º analista</b>			0,000208025

Estándar	<u>0,055537106</u>	x $\frac{1}{1}$	x <u>97,67%</u>
De Referencia	250		



**FACTOR St 2º analista**

0,000216972

**Muestras**

250  
Pmp

FACTOR mp

250

PESO PROMEDIO DE MUESTRA

260,2

Concentración de muestra	Peso de muestra		Áreas		g/ tab	
	1 º analista	2º analista	1º analista	2º analista	1 º analista	2º analista
Precisión Intermedia 80%	230,8	212,4	2139,98633	1853,6261	125,469456	123,1740865
			2141,55078	1859,57825	125,561182	123,5696089
Precisión Intermedia 100%	280,3	261,1	2568,03589	2229,56152	123,976912	120,5214408
			2576,54443	2237,34863	124,387678	120,9423817
Precisión Intermedia 120%	328,3	321,6	3060,74927	2835,33008	126,159423	124,4340716
			3061,8044	2803,87793	126,202914	123,0537317
PROMEDIO					125,292927	122,6158869
RSD %					0,73439961	1,258494117
PROMEDIO ENTRE DOS ANALISTAS						123,95
RSD % ENTRE DOS ANALISTAS						1,49

e) Linealidad

e.1) Método Operatorio:

Moler 20 tabletas de la muestra en un mortero. Preparar concentraciones de la muestra al 50, 75, 100, 125 y 150 % por triplicado cada concentración.

- Solución al 50%:

Pesar exactamente alrededor de 130 mg de polvo en una fiola de 250 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Solución al 75 %:

Pesar exactamente alrededor de 195 mg de polvo en una fiola de 250 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Solución al 100 %:

Pesar exactamente alrededor de 260 mg de polvo en una fiola de 250 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Solución al 125 %:

Pesar exactamente alrededor de 325 mg de polvo en una fiola de 250 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Solución al 150 %:

Pesar exactamente alrededor de 390 mg de polvo en una fiola de 250 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

Injectar en el sistema en orden creciente.

#### e.2) Cálculo Estadístico:

Calcular de la misma manera que lo especificado en el punto 4.3.1.1. b.2

#### **Criterios de aceptación:**

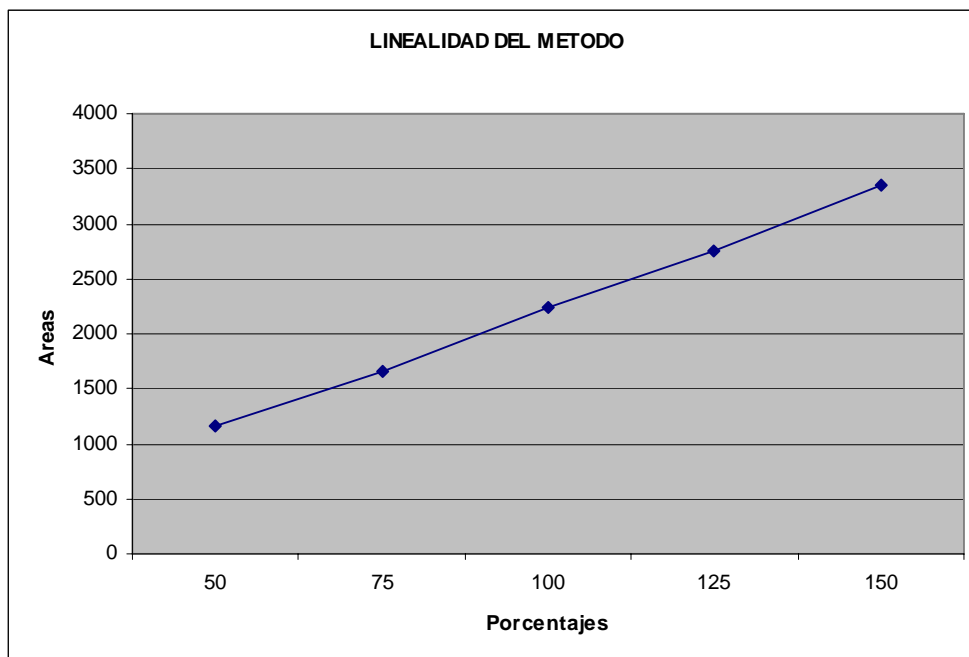
"r" "mínimo 0,995

"r<sup>2</sup>" mínimo 0,99

t<sub>regresión</sub> mayor a t<sub>tabla</sub>

#### e.3) Resultados:





f) Rango

**TABLA 13. RANGO DEL METODO DE CLONIXINATO DE LISINA**

PARAMETROS EVALUADOS	EXACTITUD	PRECISION	LINEALIDAD
	RANGO	RANGO	RANGO
	80% - 120%	80% - 120%	50% - 150%
RESULTADO	Conforme	Conforme	Conforme

8.3.2.2. Para Pargeverina Clorhidrato:

a) Selectividad

a.1) Método Operatorio:

Preparar el estándar al 100%.

Pesar exactamente alrededor de 20 mg de pargeverina clorhidrato estándar en una fiola de 100 ml. Añadir aproximadamente 50 ml de solución diluyente correspondiente, agitar hasta disolver, enrasar y

homogenizar. Tomar 5 ml de la solución anterior en una fiola de 10 ml y llevar a volumen. Homogenizar y filtrar. Inyectar en el sistema una vez.

Preparar una solución de placebo de excipientes pesando 500 mg de polvo en una fiola de 200 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente e inyectar en el sistema.

Preparar una solución de placebo de excipientes pesando 500 mg de polvo y 20 mg de pargoverina clorhidrato en una fiola de 200 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente e inyectar en el sistema.

Inyectar también solución diluyente y fase móvil.

a.2) Resultados (Ver anexos 7 y 8):

**TABLA 14. SELECTIVIDAD DEL METODO DE PARGEVERINA CLORHIDRATO.**

Sustancia Tratada		Evaluado en el método	Condiciones	Observaciones
Estándar	al 100%	Sí	*	Si hay respuesta aprox. al 1,8 minutos
Placebo	Excipientes	Sí	*	No hay respuesta
Placebo + p.a.	AI 100%	Sí	*	Si hay respuesta aprox. al 1,8 minutos
Solvente	HCl 0,01 N	Sí	*	No hay respuesta
Fase móvil	HCl 0,001 N: Metanol (37:68)+ 2g LAURIL SULFATO	Sí	*	No hay respuesta

\* Las que se señalan en la parte experimental

b) Exactitud

b.1) Método Operatorio:

Injectar en el sistema 7 inyecciones de solución estándar de pargeverina clorhidrato al 100%, preparado como se indica en la precisión del sistema.

Preparar soluciones de pargeverina clorhidrato QP añadiéndole placebo de excipientes en concentraciones al 80%, 100% y 120% por triplicado e injectar en el sistema cada solución.

- Solución al 80%:

Pesar exactamente alrededor de 16 mg de pargeverina clorhidrato QP y 504 mg de placebo de excipientes en una fiola de 200 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Solución al 100%:

Pesar exactamente alrededor de 20 mg de pargeverina clorhidrato QP y 500 mg de placebo de excipientes en una fiola de 200 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Solución al 120%:

Pesar exactamente alrededor de 24 mg de pargeverina clorhidrato QP y 496 mg de placebo de excipientes en una fiola de 200 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

#### b.2) Cálculo Estadístico:

Calcular de la misma manera que lo especificado en el punto 4.3.2.1. b.2

#### **Criterios de aceptación:**

98% -102%

RSD máximo 2%

b.3) Resultados:

**TABLA 15. EXACTITUD DEL METODO DE PARGEVERINA CLORHIDRATO**

**Estandar de referencia**

Nombre                      Pargeverina Clorhidrato  
Peso                         21,33

N° de Inyección	Areas	Amount
1	828,10260	0,025757678
2	827,25897	0,025783945
3	827,38519	0,025780012
4	830,13629	0,025694576
5	828,57861	0,02574288
6	826,99371	0,025792216
7	827,43536	0,025778449
Promedio	827,98439	0,025761394
RSD %	0,13	0,13

**DILUCIONES**

Estandar                      0,025761394                      x 5  
De Referencia                      100                      10

FACTOR St :    0,000128807

Muestras                      200  
Peso (mg)

FACTOR mp :        200

PORCENTAJE TEORICO	CANTIDAD AGREGADA (mg)	AREAS	CANTIDAD ENCONTRADA (mg)	PORCENTAJE RECUPERADO
Exactitud 80%	16,8	656,57812	16,91	100,68
	16,9	657,33972	16,93	100,20
	16,9	658,97296	16,98	100,45
Exactitud 100%	21,3	818,58228	21,09	99,00
	21,1	827,95508	21,33	101,09
	21,2	831,58942	21,42	101,05
Exactitud 120%	26,9	1031,98389	26,59	98,83
	26,7	1042,33521	26,85	100,57

26,5	1052,33398	27,11	102,30
		<b>PROMEDIO</b>	100,46
		<b>RSD %</b>	1,06
<b>T exp</b>	1,315335327		
<b>T tabla</b>	2,306		

### c) Precisión o Repetibilidad

#### c.1) Método Operatorio:

Inyectar en el sistema 7 inyecciones de solución estándar de pargeverina clorhidrato al 100%, preparado como se indica en la precisión del sistema.

Moler 20 tabletas de la muestra en un mortero. Pesa exactamente alrededor de 520 mg de polvo en una fiola de 200 ml y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente. Preparar por sextuplicado e inyectar por duplicado en el sistema.

#### c.2) Cálculo Estadístico:

Calcular de la misma manera que lo especificado en el punto 4.3.1.1. a.2

**Criterios de aceptación:** RSD máximo 2%

#### c.3) Resultados:



**TABLA 16. PRECISION DEL METODO CON LA MUESTRA : REPETIBILIDAD DE PARGEVERINA CLORHIDRATO**

**Estándar de referencia**  
**Nombre** Pargeverina Clorhidrato  
**Potencia %** 101,12%  
**Peso (mg)** **ST** 21,1

N° de Inyección	Areas	Factor st
1	828,10260	0,025479934
2	827,25897	0,025505919
3	827,38519	0,025502028
4	830,13629	0,025417513
5	828,57861	0,025465297
6	826,99371	0,0255141
7	827,43536	0,025500481
<b>Promedio</b>	827,98439	0,02548361
<b>RSD %</b>	0,13198896	0,13

**DILUCIONES**

**Estandar**  $\frac{0,02548}{200}$  101,12%  
**FACTOR St** 0,000128845

**Muestras**

$\frac{200}{\text{Pmp}}$   
**FACTOR MP** 200  
**PESO PROMEDIO DE MUESTRA** 260,2

N ° de muestra	PESO (mg)	AREA	mg/tableta
1	520,6	823,2334	10,60
		823,67181	10,61
2	520,7	820,30811	10,56
		823,21906	10,60
3	520,9	839,32062	10,80
		840,36292	10,82
4	520,5	839,68274	10,82
		840,69824	10,83
5	520,7	836,20551	10,77
		838,89429	10,80
6	520,4	832,86053	10,73
		832,66064	10,73
		PROMEDIO	10,72
		RSD	0.94

d) Precisión Intermedia

d.1) Método Operatorio:

Dos analistas en diferentes días realizarán el ensayo, cada uno debe inyectar en el sistema 5 inyecciones de solución estándar de pargeverina clorhidrato al 100%, preparado como se indica en la precisión del sistema.

Moler 20 tabletas de la muestra en un mortero. Preparar soluciones de muestra en concentraciones al 80%, 100% y 120% e inyectar en el sistema por duplicado cada solución.

- Solución al 80%:

Pesar exactamente alrededor de 504 mg de muestra en una fiola de 200 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Solución al 100%:

Pesar exactamente alrededor de 520 mg de muestra en una fiola de 200 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Solución al 120%:

Pesar exactamente alrededor de 624 mg de muestra en una fiola de 200 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

d.2) Cálculo Estadístico:

Calcular de la misma manera que lo especificado en el punto 4.3.1.1. a.2 para los resultados obtenidos de los dos analistas.

**Criterio de aceptación:** RSD máximo 2%

d.3) Resultados:

**TABLA 17. PRECISION INTERMEDIA DEL METODO PARA PARGEVERINA CLORHIDRATO**

Estándar de referencia			
<b>Nombre</b>		Pargeverina Clorhidrato	
<b>Potencia %</b>		101,12	
<b>Peso (mg)</b>			
st 1º analista		20,6	
st 2º analista		20,9	
1 º ANALISTA		2º ANALISTA	
Areas	Factor de st	Areas	Factor de st
937,75824	0,02197	980,95691	0,02131
936,17657	0,02200	981,25177	0,02130
937,76251	0,02197	981,49359	0,02129
932,35254	0,02209	980,90747	0,02131
935,75391	0,02201	981,47113	0,02129
<b>Promedio</b>	0,02201	<b>Promedio</b>	0,02130
<b>rsd %</b>	0,24	<b>rsd %</b>	0,03

<b>Diluciones</b>			
Estándar	<u>0,022009568</u>	x <u>5</u>	x <u>1,0112</u>
De Referencia	100	10	
<b>FACTOR St 1º analista</b>			0,00011128
Estándar	<u>0,021300099</u>	x <u>5</u>	x <u>1,0112</u>
De Referencia	100	10	
<b>FACTOR St 2º analista</b>			0,000107693

<b>Muestras</b>	<u>200</u>
	Pmp
FACTOR mp	200
PESO PROMEDIO DE MUESTRA	260,2

Concentración de muestra	Peso de muestra		Areas		mg/tab	
	1 º analista	2º analista	1º analista	2º analista	1 º analista	2º analista
Precisión Intermedia 80%	416,6	428,4	754,93274	817,7442	10,4940922	10,6977878
			754,13037	817,05029	10,4829387	10,68871002
Precisión Intermedia 100%	520,3	537,5	946,66193	1039,90161	10,5365144	10,84275764
			944,99371	1039,05164	10,5179469	10,83389525
Precisión Intermedia 120%	624,7	644,7	1106,86401	1203,19812	10,260739	10,45936799
			1105,79053	1204,22229	10,2507877	10,46827107
PROMEDIO					10,4238365	10,66513163
RSD %					1,26202348	1,584282766

<b>PROMEDIO ENTRE DOS ANALISTAS</b>	10,54
<b>RSD % ENTRE DOS ANALISTAS</b>	1,82

e) Linealidad

e.1) Método Operatorio:

Moler 20 tabletas de la muestra en un mortero. Preparar concentraciones de la muestra al 50, 75, 100, 125 y 150 % por triplicado cada concentración.

- Solución al 50%:

Pesar exactamente alrededor de 260 mg de polvo en una fiola de 200 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Solución al 75 %:

Pesar exactamente alrededor de 390 mg de polvo en una fiola de 200 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Solución al 100 %:

Pesar exactamente alrededor de 520 mg de polvo en una fiola de 200 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Solución al 125 %:

Pesar exactamente alrededor de 650 mg de polvo en una fiola de 200 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

- Solución al 150 %:

Pesar exactamente alrededor de 780 mg de polvo en una fiola de 200 ml, y llevar a volumen con solución diluyente, realizando el tratamiento correspondiente.

Injectar en el sistema en orden creciente.

e.2) Cálculo estadístico:

Calcular de la misma manera que lo especificado en el punto 4.3.1.1. b.2

**Criterios de aceptación:**

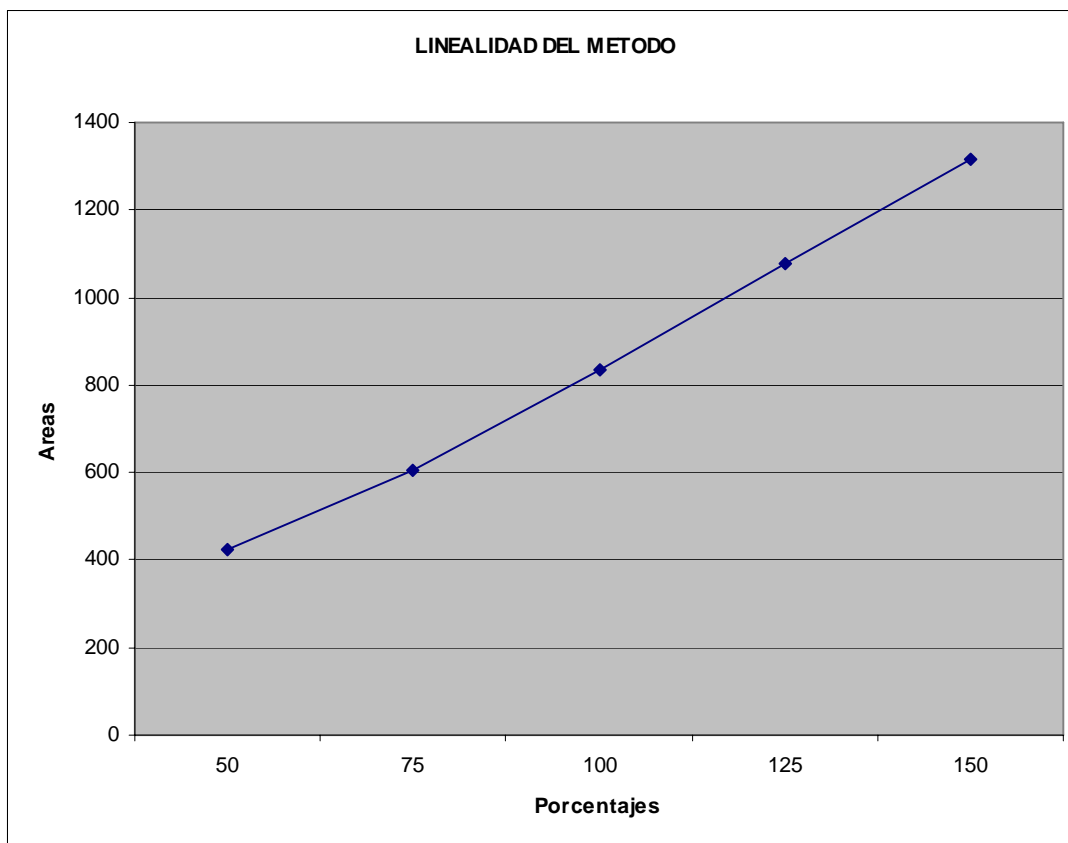
"r" mínimo 0,995

"r<sup>2</sup>" mínimo 0,99

t<sub>regresión</sub> mayor a t<sub>tabla</sub>

e.3) Resultados:





f) Rango

**TABLA 19. RANGO DEL METODO DE PARGEVERINA CLORHIDRATO**

PARAMETROS EVALUADOS	EXACTITUD	PRECISION	LINEALIDAD
RANGO	80% - 120%	80% - 120%	80% - 120%
RESULTADO	Conforme	Conforme	Conforme

## IX. RESULTADOS

CERTIFICADO DE VALIDACION DE CLONIXINATO DE LISINA		
TIPO DE VALIDACION		
PROSPECTIVA		
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
<b>APTITUD DEL SISTEMA</b>		
PRECISION DEL SISTEMA Desviación estándar relativa (RSD)	Máximo 2%	0.12
LINEALIDAD DEL SISTEMA Coeficiente de correlación ( r )	mínimo 0,995	0,99973
Coeficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	mínimo 0,99	0,99947
Test estadístico para el "r" P = 0,05 ; y n - 2 grados de libertad	t <sub>regresion</sub> > t <sub>tabla</sub>	t <sub>regresion</sub> = 156,14663 > t <sub>tabla</sub> = 2,160
<b>PARAMETROS DE DESEMPEÑO</b>		
SELECTIVIDAD Lectura del Estándar Lectura del placebo Lectura del placebo + p.a. Lectura del solvente Lectura de la fase móvil	Hay respuesta No hay respuesta Hay respuesta No hay respuesta No hay respuesta	Hay respuesta al 1,9 minutos Conforme Hay respuesta al 1,9 minutos Conforme Conforme
EXACTITUD DEL METODO Porcentaje de recuperación	98% -102%	100,96
Desviación estándar relativa (RSD)	No debe ser mayor de 2%	1,49
Test de recuperación media P = 0,05 ; y n - 1 grados de libertad	t <sub>exp</sub> < t <sub>tabla</sub>	t <sub>exp</sub> = 1,93680 < t <sub>tabla</sub> = 2,306
PRECISION DEL METODO Desviación estándar relativa (RSD)	Máximo 2%	0,62
PRECISION INTERMEDIA Desviación estándar relativa (RSD) entre dos analistas	Menor al 2 %	1,49
LINEALIDAD DEL METODO Coeficiente de correlación ( r )	mínimo 0,995	0,998058
Coeficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	mínimo 0,99	0,996119
Test estadístico para el "r" P = 0,05 ; y n - 2 grados de libertad	t <sub>regresion</sub> > t <sub>tabla</sub>	t <sub>regresion</sub> = 57,767106 > t <sub>tabla</sub> = 2,160
RANGO DEL METODO Exactitud Precisión Linealidad	80%-120%	Conforme



CERTIFICADO DE VALIDACION DE PARGEVERINA CLORHIDRATO		
TIPO DE VALIDACION		
PROSPECTIVA		
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
<b>APTITUD DEL SISTEMA</b>		
PRECISION DEL SISTEMA Desviación estándar relativa (RSD)	Máximo 2%	0,13
LINEALIDAD DEL SISTEMA Coeficiente de correlación ( r )' Coeficiente de determinación (r <sup>2</sup> ) Test estadístico para el "r" P = 0,05 ; y n - 2 grados de libertad	mínimo 0,995  mínimo 0,99  t <sub>regresion</sub> > t <sub>tabla</sub>	0,99605  0,99212  t <sub>regresion</sub> = 40,44678 > t <sub>tabla</sub> = 2,160
<b>PARAMETROS DE DESEMPEÑO</b>		
SELECTIVIDAD Lectura del Estándar Lectura del placebo Lectura del placebo + p.a. Lectura del solvente Lectura de la fase móvil	Hay respuesta No hay respuesta Hay respuesta No hay respuesta No hay respuesta	Hay respuesta al 1,8 minutos Conforme Hay respuesta al 1,8 minutos Conforme Conforme
EXACTITUD DEL METODO Porcentaje de recuperación	98% -102%	100,46
Coeficiente de variación	No debe ser mayor de 2%	1,06
Test de recuperación media P = 0,05 ; y n - 1 grados de libertad	t <sub>exp</sub> < t <sub>tabla</sub>	t <sub>exp</sub> = 1,31534 < t <sub>tabla</sub> = 2,306
PRECISION DEL METODO Desviación estándar relativa (RSD)	Máximo 2%	0,94
PRECISION INTERMEDIA Desviación estándar relativa (RSD) entre dos analistas	Menor al 2 %	1,82
LINEALIDAD DEL METODO Coeficiente de correlación ( r ) Coeficiente de determinación (r <sup>2</sup> ) Test estadístico para el "r" P = 0,05 ; y n - 2 grados de libertad	mínimo 0,995  mínimo 0,99  t <sub>regresion</sub> > t <sub>tabla</sub>	0,99860  0,99720  t <sub>regresion</sub> = 68,03093 > t <sub>tabla</sub> = 2,160
RANGO DEL METODO Exactitud Precisión Linealidad	80%-120%	Conforme

## X. DISCUSIONES

### 1. Aptitud del Sistema

Para el principio activo del clonixinato de lisina se realizaron los ensayos para establecer la precisión y linealidad del sistema.

En el estudio de precisión el sistema mostró una buena repetibilidad de los resultados, obteniéndose una desviación estándar relativa (rsd) de 0,12%, siendo el valor máximo permitido de 2%.

En el estudio de linealidad del sistema se analizaron las siguientes concentraciones: 50%, 75%, 100%, 125% y 150%; siendo el 100% la concentración de 0,5 mg/ml, las cuales al ser evaluadas estadísticamente dieron como resultado un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0,99773, siendo el valor mínimo permitido de 0,995 y un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0,99947, siendo el valor mínimo permitido de 0,99, lo cual demuestra que existe una relación lineal entre la variable independiente de concentración ( $x$ ) y la variable dependiente de absorbancia o de respuesta ( $y$ ). Para confirmar que dicha relación es lineal se aplicó el test de regresión o test student, donde el valor de  $t_{\text{regresion}} = 156,14663$  es mayor a  $t_{\text{tabla}} = 2,160$  con una probabilidad de cometer error de 0,05% y  $n - 2$  grados de libertad.

Para el principio activo de pargaverina clorhidrato se realizaron los ensayos para establecer la precisión y linealidad del sistema.

En el estudio de precisión el sistema mostró una buena repetibilidad de los resultados, obteniéndose una desviación estándar relativa (rsd) de 0,13%, siendo el valor máximo permitido de 2%.

En el estudio de linealidad del sistema se analizaron las siguientes concentraciones: 40%, 80%, 100%, 120% y 160%; siendo el 100% la concentración de 0,10 mg/ml, las que al ser evaluadas estadísticamente dieron como resultado un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0,99605, el cual tiene como valor mínimo permitido 0,995 y un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0,99212, donde el valor mínimo permitido de  $r^2$  es 0,99 lo que demuestra que existe una relación lineal entre la variable independiente de concentración ( $x$ ) y la variable dependiente de absorbancia o de respuesta ( $y$ ). Para confirmar que dicha relación es lineal se aplicó el test de regresión o test student, donde el valor de  $t_{\text{regresion}} = 40,44678$  es mayor a  $t_{\text{tabla}} = 2,160$  con una probabilidad de cometer error de 0,05% y  $n - 2$  grados de libertad.

Estos resultados evidencian un sistema integral.

## 2. Selectividad:

En el estudio de selectividad para ambos principios activos, clonixinato de lisina y pargerverina clorhidrato, los cromatogramas del estándar y del placebo más principio activo dieron respuesta de absorbancia al mismo tiempo de retención. Y los cromatogramas de placebo, solventes y fase móvil no mostraron respuesta de absorbancia en los tiempos de retención de los analitos de interés. Estos resultados evidencian que el método es selectivo.

## 3. Exactitud del método:

Para el principio activo de clonixinato de lisina, en el estudio de exactitud se recuperó el 100,96% del principio activo siendo los límites aceptables de 98 -102%, y el valor del coeficiente de variación es 1,49%, siendo lo permitido máximo 2%.

Para demostrar que no hay diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% se aplicó un test de student donde el valor de  $t_{exp} = 1,93680$  es menor a  $t_{tabla} = 2,306$  con una probabilidad de cometer error de 0,05% y  $n - 1$  grados de libertad.

Para el principio activo de pargaverina clorhidrato, en el estudio de exactitud se recuperó el 100,46% del principio activo, siendo los límites aceptables de 98 -102%, y el valor del coeficiente de variación es 1,06%, siendo lo permitido máximo 2%.

Para demostrar que no hay diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% se aplicó un test de student donde el valor de  $t_{exp} = 1,31534 < t_{tabla} = 2,306$  con una probabilidad de cometer error de 0,05% y  $n - 1$  grados de libertad.

Estos resultados evidencian que el método es exacto.

#### 4. Precisión del método

Para el principio activo clonixinato de lisina, el estudio de precisión del método mostró una buena reproducibilidad de los resultados, obteniéndose una desviación estándar relativa (rsd) de 0,62% siendo el valor máximo de 2%.

Para el principio activo pargaverina clorhidrato, el estudio de precisión del método mostró una buena reproducibilidad de los resultados,

obteniéndose una desviación estándar relativa (rsd) de 0,94%, siendo el valor máximo de 2%.

Estos resultados evidencian que el método es preciso.

#### 5. Precisión intermedia

Para el principio activo clonixinato de lisina, en el estudio de precisión intermedia, dos analistas analizaron en las siguientes concentraciones: al 80%, 100% y 120%, resultando un RSD entre ambos de 1,49%, siendo el valor máximo de 2%.

Para el principio activo pargerverina clorhidrato, en el estudio de precisión intermedia, dos analistas analizaron en las siguientes concentraciones: al 80%, 100% y 120 %, resultando un RSD entre ambos de 1,82 %, siendo el valor máximo de 2%.

Estos resultados evidencian que el método es preciso cuando lo realizan diferentes analistas.

#### 6. Linealidad del método

Para el principio activo clonixinato de lisina, en el estudio de linealidad del método se analizaron las siguientes concentraciones: 50%, 75%, 100%, 125% y 150%; siendo el 100% la concentración de 0,5 mg/ml, las cuales al ser evaluadas estadísticamente dieron un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0,998058, siendo el valor mínimo permitido de 0,995 y un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0,996119, siendo el valor mínimo permitido de 0,99; lo que demuestra que existe una relación lineal entre

la variable independiente de concentración (x) y la variable dependiente de absorbancia o de respuesta (y). Para confirmar que dicha relación es lineal se aplicó el test de regresión o test student, donde el valor de  $t_{\text{regresion}} = 57,767106$  es mayor a  $t_{\text{tabla}} = 2,160$  con una probabilidad de cometer error de 0,05% y  $n - 2$  grados de libertad.

Para el principio activo de pargaverina clorhidrato, en el estudio de linealidad del sistema se analizaron las siguientes concentraciones: 50%, 75%, 100%, 125% y 150%; siendo el 100% la concentración de 0,10 mg/ml, las cuales al ser evaluadas estadísticamente dieron como resultado un coeficiente de correlación (r) de 0,99860, siendo el valor mínimo permitido de 0,995 y un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0,99720, siendo el valor mínimo permitido de 0,99; lo que demuestra que existe una relación lineal entre la variable independiente de concentración (x) y la variable dependiente de absorbancia o de respuesta (y). Para confirmar que dicha relación es lineal se aplicó el test de regresión o test student, donde el valor de  $t_{\text{regresion}} = 68,03093 > t_{\text{tabla}} = 2,160$  con una probabilidad de cometer error de 0,05% y  $n - 2$  grados de libertad.

Estos resultados evidencian que el método es lineal.

## 7. Rango

Para el principio activo clonixinato de lisina, el rango de concentraciones de 80% a 120% es preciso, exacto y lineal.

Para el principio activo pargaverina clorhidrato, el rango de concentraciones de 80% a 120% es preciso, exacto y lineal.

## XI. CONCLUSIONES

La nueva técnica analítica desarrollada para la cuantificación de clonixinato de lisina 125 mg y pargeverina clorhidrato 10 mg tabletas recubiertas por cromatografía líquida de alta Performance, cumple con los parámetros de desempeño de la validación, demostrando su confiabilidad. De esta forma se garantizará la calidad, eficacia e inocuidad del nuevo medicamento.

## **XII. ANEXO**



## ANEXO N° 1 FOTOGRAFÍAS DE EQUIPOS UTILIZADOS PARA LA VALIDACIÓN.



A. AGITADOR DE FIOLAS

Marca: BURELL  
Modelo: 75  
Serie: 016028



B. BALANZA ANALÍTICA

Marca: OHAUS  
Modelo: V12140  
Serie: G2761121381998P



### C. BOMBA DE VACÍO

Marca: GENERAL  
ELECTRIC/MILLIPORE  
Modelo: 5KH33EN25T  
Serie: 0780



### D. CROMATOGRAFO LÍQUIDO DE ALTA RESOLUCIÓN MERCK LAHCROM.



#### E. PURIFICADOR DE AGUA


Marca: Milli-Q  
 gradiente/MILLIPORE  
 Modelo: F4HN68318  
 Serie: QGARDOOD2




#### F. SONICADOR BRANSON.

Marca: BRANSON  
 Modelo: 3510  
 Serie: RMC050025187E

**ANEXO 2. CERTIFICADO DE ANALISIS DE ESTÁNDAR DE CLONIXINATO  
DE LISINA.**

 <b>FARMACEUTICA DEL PACIFICO S.A.C.</b>	<b>PROTOCOLO DE ANALISIS MATERIA PRIMA CLONIXINATO DE LISINA</b>	Versión 01 Emisión: 01-02-06 Pag 1 de 1
Codigo : 2503893      Proveedor Original : WENDT-CHEMIE No de Ingreso : 5000307973      Lote Prov. Original : 128 Lote SAP : 0019996      Embalaje: Tambor de fibra / bolsa plastica transparente. Almacenamiento : <u>Preservar en envases impermeables.</u>		
<b>REFERENCIA : Técnica Proveedor</b>		
<b>ENSAYO</b>	<b>ESPECIFICACIONES</b>	<b>RESULTADOS</b>
Descripción	Polvo fino de color ligeramente amarillo palido libre de particulas xtrañas	Conforme
Solubilidad	Soluble en agua, etanol y metanol	Conforme
Identificación	Test A (IR)	Conforme
pH	6.5% -8.5%	7.35%
Cenizas sulfatadas	< 0.1%	0.0%
Perdida por secado	NMQ <1%	0.004%
Valoración	90-100%	97.67%
<b>PROVEEDOR APROBADO :</b> WENDT-CHEMIE <b>PROVEEDOR INTERMEDIARIO :</b> N.A.		
ANALIZADO FISICOQUIMICO POR : J. Ponce      FECHA : 10/03/2007      Tpo: 5H C REVISADO POR : P.Cumpa V.      FECHA : 10/03/2007		
Fecha Vencimiento : 31/10/2008 Fecha Reanálisis : 31/03/2008		
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <b>APROBADO:</b> <input checked="" type="checkbox"/> </div> <div style="text-align: center;"> <b>RECHAZADO:</b> <input type="checkbox"/> </div> </div> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> <u>A. Betetta O.</u>  <b>Q.F. JEFE DE CONTROL DE CALIDAD</b> </div>		

**ANEXO 3. CERTIFICADO DE ANALISIS DE ESTÁNDAR DE PARGEVERINA  
CLORHIDRATO.**

 <b>FARMACEUTICA DEL PACIFICO</b> S.A.C.	<b>PROTOCOLO DE ANALISIS MATERIA PRIMA PARGEVERINA CLORHIDRATO</b>	Versión N° 2 Emisión: 04-01-06 Página 1 de 1
Codigo : <u>10507401</u> Proveedor Original : <u>Selectchemie AG</u> No de Ingreso : <u>49086354435</u> Lote Prov. Original : <u>5030</u> Lote SAP : <u>0118945</u> Embalaje : <u>Tambor de fibra</u> Almacenamiento : <u>Conservar en envases impermeables.</u>		
<b>REFERENCIA: Técnica Proveedor</b>		
<b>ENSAYO</b>	<b>ESPECIFICACIONES</b>	<b>RESULTADOS</b>
Descripción	Polvo cristalino blanco inodoro	Conforme
Identificación	IR	Conforme
Punto de Fusión	170°C -175°C	170°C
Pérdida por secado	No más que 0.5%	<0.1%
Residuo de ignición	No más que 0.1%	<0.1%
Metales Pesados	No más que 10 ppm	<10 ppm
Pureza Cromatográfica		
Impureza Individual	No más que 0.2%	<0.1%
Impurezas Totales	No más que 0.5%	<0.1%
Tamaño de partícula	No más que 100 um	<100 um
Solvente residual Isopropanol	No más que 0.5%	No detectable
Valoración	98% -102%	101.12%
Control Microbiológico		
Recuento Bacterias Aerobicas Totales	No mas que 1000 UFC/g	<1000UFC/g
Recuento Hongos y levaduras	No mas que 100UFC/g	<100 UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	Ausente
<i>Salmonella sp</i>	Ausente	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente	Ausente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente	Ausente
<b>PROVEEDOR APROBADO :</b> <u>Selectchemie AG</u> <b>PROVEEDOR INTERMEDIARIO :</b> <u>N.A</u>		
ANALIZADO FISICOQUIMICO POR : <u>P.Cumpa V.</u> <u>15/05/07</u> Tpo: 5.0h REVISADO POR : <u>J.Ponce C.</u> <u>15/05/07</u>		
Fecha Vencimiento : <u>05/10/2010</u> Fecha Reanálisis : <u>31/05/2008</u>		
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div> <b>APROBADO :</b>    <input checked="" type="checkbox"/> </div> <div> <b>RECHAZADO:</b>    <input type="checkbox"/> </div> </div> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> <b>A. Betetta O.</b>  <b>Q.F. JEFE DE CONTROL DE CALIDAD</b> </div>		



# ANEXO 4. TABLA ESTADÍSTICA DE LA DISTRIBUCION "t" DE STUDENT.

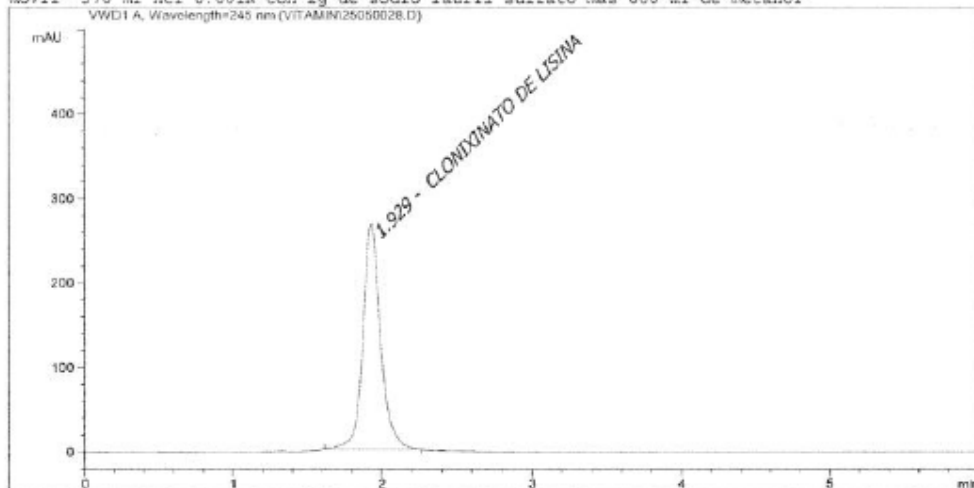
$\alpha$ $\nu$	0.100	0.050	0.025	0.010	0.005	0.001
1	6.314	12.706	25.452	63.657		
2	2.920	4.303	6.205	9.925	14.069	31.598
3	2.353	3.182	4.176	5.841	7.453	12.941
4	2.132	2.776	3.495	4.604	5.598	8.610
5	2.015	2.571	3.163	4.032	4.773	6.859
6	1.943	2.447	2.969	3.707	4.317	5.959
7	1.895	2.365	2.841	3.499	4.029	5.405
8	1.860	2.306	2.752	3.355	3.832	5.041
9	1.833	2.262	2.685	3.250	3.690	4.781
10	1.812	2.228	2.634	3.169	3.581	4.587
11	1.796	2.201	2.593	3.106	3.497	4.437
12	1.782	2.179	2.560	3.055	3.428	4.318
13	1.771	2.160	2.533	3.012	3.372	4.221
14	1.761	2.145	2.510	2.977	3.326	4.140
15	1.753	2.131	2.490	2.947	3.286	4.073
16	1.746	2.120	2.473	2.921	3.252	4.015
17	1.740	2.110	2.458	2.898	3.222	3.965
18	1.734	2.101	2.445	2.878	3.197	3.922
19	1.729	2.093	2.433	2.861	3.174	3.883
20	1.725	2.086	2.423	2.845	3.153	3.850
21	1.721	2.080	2.414	2.831	3.135	3.819
22	1.717	2.074	2.406	2.818	3.118	3.792
23	1.714	2.069	2.398	2.807	3.104	3.767
24	1.711	2.064	2.391	2.797	3.090	3.745
25	1.708	2.060	2.385	2.787	3.078	3.725
26	1.706	2.056	2.379	2.779	3.067	3.707
27	1.703	2.052	2.373	2.771	3.056	3.690
28	1.701	2.048	2.368	2.763	3.047	3.674
29	1.699	2.045	2.364	2.756	3.038	3.659
30	1.697	2.042	2.360	2.750	3.030	3.646
35	1.690	2.030	2.342	2.724	2.996	3.591
40	1.684	2.021	2.329	2.704	2.971	3.551
45	1.680	2.014	2.319	2.690	2.952	3.520
50	1.676	2.008	2.310	2.678	2.937	3.496
55	1.673	2.004	2.304	2.669	2.925	3.476
60	1.671	2.000	2.299	2.660	2.915	3.460
70	1.667	1.994	2.290	2.648	2.889	3.435
80	1.665	1.989	2.284	2.638	2.887	3.416
90	1.662	1.986	2.279	2.631	2.878	3.402
100	1.661	1.982	2.276	2.625	2.871	3.390
120	1.658	1.980	2.270	2.617	2.860	3.373
Ley normal	1.645	1.960	2.241	2.576	2.807	3.291

## ANEXO 5. CROMATOGRAMA DEL ESTANDAR DE CLONIXINATO DE LISINA

```

Injection Date : 6/23/07 6:13:37 PM      Seq. Line : 12
Sample Name    : ST CLON                  Vial : 11
Acq. Operator  : L. ACOSTA C              Inj : 6
                                           Inj Volume : 5 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\CLONVAL.M
Last changed   : 6/23/07 6:11:51 PM by L. ACOSTA C
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CLONVAL.M
Last changed   : 8/7/07 1:20:28 PM by P. CUMPA V.
Y. AZANA S. VALIDACION DE CLONIXINATO DE LISINA FLUJO 1.5ML/MIN COLUMNA RP SELECT B A/002 fase
movil *370 ml hcl 0.001N con 2g de sodio lauril sulfato mas 680 ml de metanol*
  
```



### External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Tuesday, August 07, 2007 1:26:41 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000

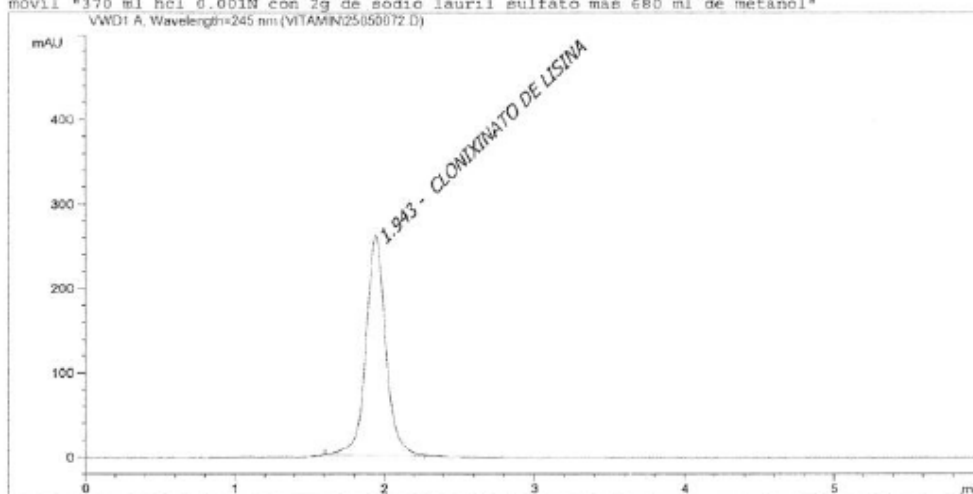
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=245 nm

RetTime Type Area Amt/Area Amount Grp Name
[min] [mAU] [s] [mg/TAB]
-----|-----|-----|-----|-----|-----
1.929 BB 2238.57715 2.14993e-4 4.81277e-1 CLONIXINATO DE LISINA

Totals : 4.81277e-1
  
```

## ANEXO 6. CROMATOGRAMA DE PLACEBO + CLONIXINATO DE LISINA

Injection Date : 6/23/07 11:27:07 PM Seq. Line : 34  
 Sample Name : L100&ML Vial : 33  
 Acq. Operator : L. ACOSTA C Inj : 1  
 Inj Volume : 5 µl  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CLONVAL.M  
 Last changed : 6/23/07 11:25:26 PM by L. ACOSTA C  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CLONVAL.M  
 Last changed : 8/7/07 1:20:28 PM by P. CUMPA V.  
 Y.AZANA S. VALIDACION DE CLONIXINATO DE LISINA FLUJO 1.5ML/MIN COLUMNA RP SELECT B A/002 fase  
 movil "370 ml hel 0.001N con 2g de sodio lauril sulfato mas 680 ml de metanol"  
 VWD1 A, Wavelength=245 nm (VITAMIN2505072.D)



### External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : Tuesday, August 07, 2007 1:26:41 PM  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=245 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU * s	Amt/Area	Amount [MG/TAB]	Grp	Name
1.943	BB	2417.46069	2.14993e-4	5.19736e-1		CLONIXINATO DE LISINA

Totals : 5.19736e-1

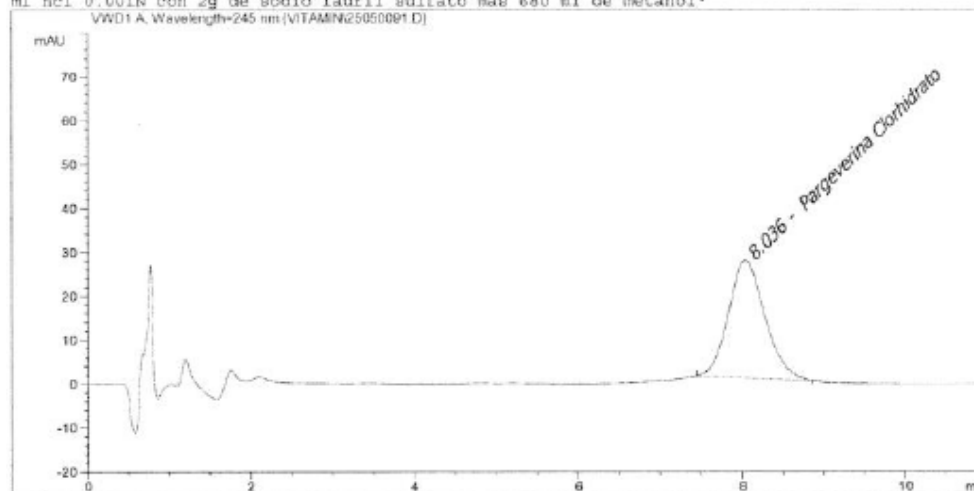


## ANEXO 7. CROMATOGRAMA DEL ESTANDAR DE PARGEVERINA CLORHIDRATO

Injection Date : 6/24/07 1:43:15 AM      Seq. Line : 44  
 Sample Name : ST PAR      Vial : 41  
 Acq. Operator : L. ACOSTA C      Inj : 1  
                                  Inj Volume : 100 µl

Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PARGVAL.M  
 Last changed : 6/23/07 2:31:36 PM by L. ACOSTA  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PARGVAL.M  
 Last changed : 6/23/07 10:00:04 AM by Y. AZANA S  
 (modified after loading)

Y. AZANA S. VALIDACION DE PARGEVERINA PLUJO 1.5ML/MIN COLUMNA RP SELECT B A/002 fase movil "370 ml hcl 0.001N con 2g de sodio lauril sulfato mas 680 ml de metanol"



### External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 6/23/07 9:57:56 AM  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

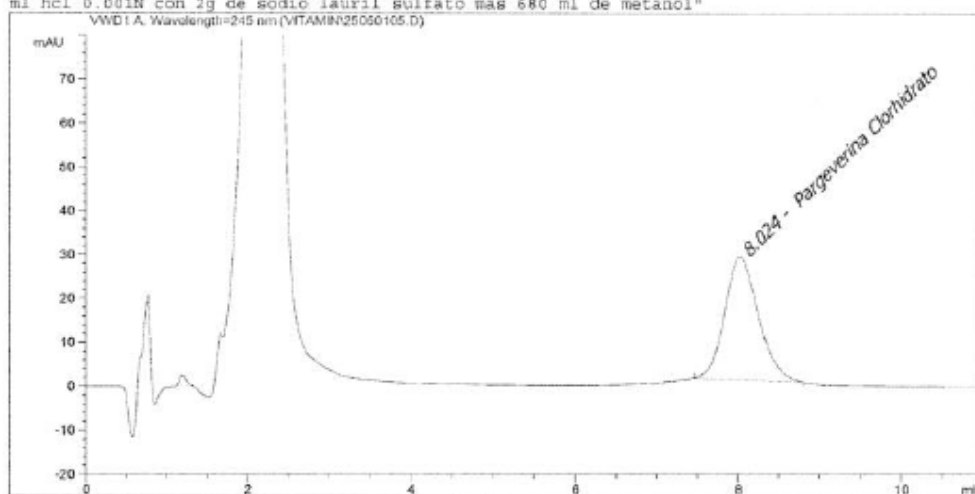
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=245 nm

RetTime	Type	Area	Ant/Area	Amount	Grp	Name
[min]		mAU *S				
8.036	BB	828.10260	1.20758e-3	1.00000		Pargeverina Clorhidrato

Totals : 1.00000

# ANEXO 8. CROMATOGRAMA DE PLACEBO + PARGEVERINA CLORHIDRATO

Injection Date : 6/24/07 5:14:07 AM Seq. Line : 49  
Sample Name : B1004M1 Vial : 45  
Acq. Operator : L. ACOSTA C Inj : 1  
Inj Volume : 100 µl  
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PARGVAL.M  
Last changed : 6/24/07 5:11:27 AM by L. ACOSTA C  
(modified after loading)  
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PARGVAL.M  
Last changed : 8/23/07 10:02:39 AM by Y.AZANA S  
(modified after loading)  
Y.AZANA S. VALIDACION DE PARGEVERINA FLUJO 1.5ML/MIN COLUMNA RP SELECT B A/002 fase movil "170  
ml hcl 0.001N con 2g de sodio lauril sulfato mas 680 ml de metanol"



External Standard Report						
Sorted By : Signal						
Calib. Data Modified : 8/23/07 10:02:12 AM						
Multiplier : 1.0000						
Dilution : 1.0000						
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=245 nm						
RetTime	Type	Area	Amt/Area	Amount	Grp	Name
[min]		mAU *s				
8.024	BB	818.58228	1.20758e-3	9.88503e-1		Pargeverina Clorhidrato
Totals :				9.88503e-1		

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. P.R. Vademécum Perú [pagina en internet], Lima; 2007 [citado 13 Noviembre del 2007]. Plidan Compuesto NF - Roemmers; [aprox. 2 pantallas].

Disponible en:

<http://www.prvademecum.com/PRData/NEWProducto.asp?P=1463>

2. Valdez AN, Cuadros QE. Validación del método de valoración de Loratadina en tabletas por HPLC. [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico] Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 1999.

3. Skoog D, Leary LJ. Análisis Instrumental, 4ta ed. Madrid, Mc Graw-Hill Interamericana España S.A, 1994.

4. Ministerio de Salud - DIGEMID. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos. Editorial Servigraf América S.R.L. Lima; 1999.

5. Master Farma [pagina en internet], Lima; 2006 [citado 2 Junio del 2007]. Plidolor ® Compuesto; [aprox. 1 pantalla].

Disponible en: [http://www.masterfarma.com/producto\\_plidolor.html](http://www.masterfarma.com/producto_plidolor.html)

6. Merck Research Laboratories, The Index Merck an Encyclopedia of Chemicals Drugs, and Biologicals, 14<sup>ava</sup> ed. New Jersey, 2006.
7. Litter M. Compendio de Farmacología, 4<sup>a</sup> ed. Buenos Aires, El Ateneo, 1997.
8. Florez J. Farmacología Humana, 4<sup>a</sup> ed. Barcelona, Masson S.A., 2003.
9. Martindale: The Complete Drug Reference [pagina en internet], Gran Bretaña; 2007 [citado 2 Junio del 2007]. Clonixin; [aprox. 2 pantalla].  
Disponible en:  
<http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current/2630-j.htm>
10. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 19<sup>ava</sup> ed. Lima, PLM Thompson, 2007.
11. Sequoia Research Products [pagina en internet], Reino Unido; [citado 2 Junio del 2007]. MATERIAL SAFETY DATA SHEET; [aprox. 2 pantallas].  
Disponible en:  
<http://www.seqchem.com/safetysheet.php?SQIndex=SRP01076p>

12. Pine S., Hendrickson J., Cram D., Hammond G., Química Orgánica, 4<sup>a</sup> ed. (2<sup>a</sup> ed. en español) México D.F., McGraw-Hill/Interamericana de México S.A. de C.V, 1992
13. United States Pharmacopeial Convention Inc., United States Pharmacopeia 30 NF-25, 2007.
14. Valls O., Del Castillo B., Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud, 4<sup>a</sup> ed. Barcelona, Ediciones Piro, 1998.
15. Bender G., Métodos Instrumentales en Química Clínica, 1<sup>a</sup> ed. Saragoza, Editorial Acribia S.A., 1992
16. Barcelli V. Curso de Entrenamiento de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) Lacrom Merck; 3-5 Febrero 2002; Lima.
17. Morales de la CC. Desarrollo y Validación Prospectiva de una técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para el Enalapril 10 mg. tabletas cubiertas. [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico] Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 2004.
18. The Global Harmonization Task Force Study Group 3. Quality Management Systems – Process Validation Guidance, [Monografía

en internet].Tokio; Febrero del 2004 [citado 2 Junio del 2007].

Disponible en: [http://www.ghtf.org/sg3/inventorysg3/sg3\\_fd\\_n99-10\\_edition2.pdf](http://www.ghtf.org/sg3/inventorysg3/sg3_fd_n99-10_edition2.pdf)

19.The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [página en internet], Bruselas; [actualizado el 31 mayo 2007; citado 2 Junio 2007]. ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures text and methodology Q2 (R1); [aprox. 1 pantalla].

Disponible en: <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>

20. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), Sección Catalana, Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad. Validación de Métodos Analíticos. Madrid; 1996.

21.Barcelli V. Curso de Desarrollo de Métodos; 10-15 Enero 2007; Lima.

22. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), UNE-EN-ISO 8402 Gestión de la calidad y aseguramiento de calidad. Vocabulario (ISO 8402:1994), Madrid; 1995.

23. Segall A. Curso de Post-grado Universidad de Buenos Aires Implementación de GLP en el Laboratorio de Control Físicoquímico; Julio 2006; Buenos Aires.

24. Cuatrecasas Ll., Gestión integral de la Calidad: Implantación, Control y Certificación, 1ª ed., Barcelona, Ediciones Gestion 2000, 1999.
25. Beneites E. La gestión técnica en la fabricación de medicamentos, Madrid, Centro de estudios superiores de la industria farmacéutica; 1996.
26. Trillo C. Tratado de Farmacia Galénica, 1ra ed. Madrid, Luzan 5 S.A.; 1993.
27. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A.C., Guía de Validación de Métodos Analíticos, México D.F., 2002.
28. Tarazona Bl. Validación del Método Analítico de Valoración del Dobesilato de Calcio 500mg capsula por Espectrofotometría de Absorción UV Visible. [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico] Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 2001.
29. Silva CG. Validación del Método de Valoración de Glimperide presentación comprimidos de 4 mg. por el Método de Cromatografía Líquida de Alta Performance HPLC. [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico] Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 2004.

30. Kanashiro L. Sistema de Gestión de Calidad y Excelencia; 24 Mayo 2004; Lima.

31. Betetta R, Vargas S., C. Comparación de perfiles de disolución de las distintas presentaciones de Nimodipino 30 mg. tabletas recubiertas existentes en el mercado. [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico] Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 2004.